



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LUJÁN

**UTILIZACIÓN DE CASEINOMACROPÉPTIDOS COMO
NUEVA ESTRATEGIA DE FORTIFICACIÓN CON CALCIO**

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Cs. Aplicadas de la Universidad
Nacional de Luján

Ing. Karina Gabriela Loria

Directoras:

Dra. María Edith Farías

Dra. Ana M. R. Pilosof

Año 2020

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Aplicadas de la Universidad Nacional de Luján fue realizado bajo una beca doctoral otorgada por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y el lugar de trabajo fue el Laboratorio de Investigación Avanzado de Alimentos de la Universidad Nacional de Luján, Sede Central.

UTILIZACIÓN DE CASEINOMACROPÉPTIDOS COMO NUEVA ESTRATEGIA DE FORTIFICACIÓN CON CALCIO

Resumen

El complejamiento del calcio con péptidos y su impacto en la biodisponibilidad de este mineral es un tema muy estudiado, pero con mucha vigencia. La potencialidad de una proteína para unir metales está asociada al tipo y secuencia de aminoácidos, su grado de fosforilación y su peso molecular. Sin embargo, su producción a grandes escalas y su uso comercial es muy limitado. Los productos lácteos se han considerado históricamente muy importantes para la salud ósea por su alta biodisponibilidad de calcio. El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido con valiosas propiedades bioactivas obtenido de la hidrólisis enzimática específica de la κ -caseína por acción de la pepsina o quimosina durante la elaboración del queso. A diferencia de otros péptidos que deben ser obtenidos por procesos de hidrólisis específicos, el CMP, se encuentra en abundancia por ser un subproducto de la industria láctea. Actualmente, su purificación se realiza a escala industrial por resinas de intercambio iónico y es un producto disponible en el mercado. El CMP presenta un alto potencial como péptido ligante de calcio por su alto contenido en ácido siálico, su cadena peptídica rica en Glu y Asp, su alta carga negativa a $\text{pH} > 4,5$, su alto grado de glicosilación especialmente de ácido siálico, la presencia de Ser fosforilada y su alta solubilidad.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar el desempeño del CMP como potencial ligante de calcio. Este trabajo está dividido en cuatro capítulos. En el primero, se evaluó la interacción entre el CMP y las sales de calcio (CaCl_2 y CaAc_2) a pH neutro a través de su comportamiento al flujo, su asociación molecular (DLS), la colorimetría y la espectroscopía FTIR. Los resultados mostraron que la presencia de calcio modificó el estado de asociación del CMP, pasando de la forma monomérica a la hexamérica. Estas estructuras se alcanzaron con una relación de 1-1,2 milimoles de CaCl_2/g de CMP. Las soluciones de CMP admitieron la incorporación de grandes cantidades de CaCl_2 sin precipitar, lo que indicaría que puede ser una excelente alternativa para vehiculizar al calcio. Por otro lado, el anión acetato aumentó la interacción péptido-péptido permitiendo la asociación del CMP, resultando en un aumento de la viscosidad y posterior gelificación.

En el segundo capítulo se estudió la interacción entre el CMP y las sales de calcio (CaCl_2 y CaAc_2) a pH 3,5 a través de su dinámica de gelificación, propiedades texturales, color y sus espectros FTIR. En estas condiciones de pH el CMP se autoensambla, por lo tanto, las muestras fueron geles. La velocidad de gelificación del CMP fue independiente de la cantidad de CaCl_2 adicionado. La organización estructural del gel no se vio afectada con la

incorporación de CaCl_2 , pero en presencia de CaAc_2 el carácter viscoso de los geles aumentó, evidenciado también por la disminución de la dureza. El cambio desde geles opacos a transparentes en presencia de CaCl_2 o CaAc_2 se debería a la formación de unidades estructurales de menor tamaño que interactúan con el Ca^{2+} , como lo muestran los espectros FTIR. Los cambios observados en estos espectros confirmarían una estructura molecular más ordenada que incluye al calcio iónico. Los geles admitieron grandes concentraciones de CaCl_2 o CaAc_2 sin alterar en gran medida las propiedades texturales. Por consiguiente, la formación de geles de CMP y sales de calcio a pH 3,5 podría ser una excelente alternativa para incrementar la solubilidad de las sales de fortificación.

Los objetivos del tercer capítulo fueron caracterizar el estado de asociación, evaluar la capacidad ligante e interpretar el mecanismo de interacción del CMP con el CaCl_2 . Las técnicas utilizadas para tal fin fueron la dispersión dinámica de luz (DLS), diálisis, conductividad, solubilidad de CaCl_2 en etanol en presencia de CMP, la estimación del calcio unido a través de un electrodo de ion selectivo, la obtención de una constante de asociación aparente y de la cantidad máxima de calcio unido según pH 7, 8 o 9. Se puede concluir que un mol de CMP une muy fuertemente un mol de calcio (relación 1:1) con una K_{ap} de $2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. Posiblemente, este sitio de alta afinidad esté relacionado con la Ser fosforilada del CMP. A concentraciones más altas de calcio en solución, cada mol de CMP liga entre 8 y 14 moles de calcio en sitios de baja afinidad y más débilmente unidos, con una K_{ap} comprendida entre 30 y 130 L mol^{-1} dependiendo del pH (de 9 a 7).

Finalmente, en el cuarto y último capítulo se evaluó la inhibición de la precipitación de sales de calcio (CaCl_2 y CaCO_3) por el CMP en un medio alcalino simulando el pH y la fuerza iónica del intestino (buffer fosfato pH 8) y se concluyó que el CMP es un efectivo ligante de calcio en condiciones básicas y que esta propiedad puede ser incrementada mediante un tratamiento previo de reversión de pH con los ácidos cítrico, fosfórico y clorhídrico. Por otro lado, se analizó el efecto del CMP en la solubilidad acuosa de sales de uso terapéutico (Ca_3Cit_2 y CaLac_2). Los resultados indicaron que la presencia de CMP aumentó la solubilidad de ambas sales. Este efecto de sobresaturación es muy interesante para optimizar la bioaccesibilidad de suplementos dietarios que utilicen estas sales. Sin dudas el CMP tiene un enorme potencial como péptido ligante de calcio y podría utilizarse tanto en la formulación de alimentos innovadores como de suplementos de uso terapéutico. Los estudios aquí expuestos constituyen una base preliminar que justificarían futuros estudios de mayor complejidad.

Palabras claves: Caseinomacropéptido, calcio, péptidos ligantes de calcio, bioaccesibilidad.

USE OF CASEINOMACROPEPTIDES AS A NEW FORTIFICATION STRATEGY WITH CALCIUM

Abstract

Calcium-binding peptides and its impact on the bioavailability of this mineral is a well-studied topic, but with a lot of validity. The potentiality of a metal binding protein is associated with the type and sequence of amino acids, its phosphorylation degree and its molecular weight. However, its large-scale production and commercial use is very limited. Dairy products have historically been considered very important for bone health because of their high calcium bioavailability. Caseinomacropeptide (CMP) is a peptide with valuable bioactive properties obtained from specific enzymatic hydrolysis of κ -casein by the action of pepsin or chymosin during cheese production. Unlike other peptides that must be obtained by specific hydrolysis processes, CMP, is found in abundance because its a byproduct of the dairy industry. Currently, its purification is carried out on industrial scale by ion exchange resins and is a product available on the market. CMP has a high potential as a calcium binding peptide due to its high sialic acid content, its peptide chain rich in Glu and Asp, its high negative charge at $\text{pH} > 4.5$, its high degree of glycosylation especially of sialic acid, the presence of phosphorylated Ser and its high solubility.

The aim of this thesis was to characterize the performance of CMP as a potential calcium binder. This work is divided into four chapters. In the first, the interaction between CMP and calcium salts (CaCl_2 and CaAc_2) at neutral pH was evaluated through its flow behavior, molecular association (DLS), colorimetry and FTIR spectroscopy. The results showed that the presence of calcium modified the association status of the CMP, going from the monomeric structure to the hexameric. These structures were achieved with a ratio of 1-1.2 millimoles of CaCl_2/g of CMP. CMP solutions allowed the addition of large amounts of CaCl_2 without precipitating, which can indicate that is an excellent alternative to transport calcium. On the other hand, the acetate anion increased peptide-peptide interaction allowing CMP association, resulting in an increase in viscosity and subsequent gelation.

The second chapter studied the interaction between CMP and calcium salts (CaCl_2 and CaAc_2) at pH 3.5 through its dynamics of gelation, textural properties, color and its FTIR spectra. Under this pH condition the CMP self-assembled, therefore, the samples were gels. The gelation rate of the CMP was independent of the amount of CaCl_2 added. The structural organization of the gel was not affected with the incorporation of CaCl_2 , but in the presence of CaAc_2 the viscous character of the gels increased, also evidenced by the decrease in hardness. The change from opaque to transparent gels in the presence of CaCl_2 or CaAc_2 can be due to the formation of

smaller structural units that interact with Ca^{2+} , as shown by the FTIR spectra. Changes observed in these spectra would confirm a more orderly molecular structure that includes ionic calcium. The gels admitted large concentrations of CaCl_2 or CaAc_2 without altering textural properties much. Therefore, the formation of CMP gels and calcium salts at pH 3.5 can be an excellent alternative to increase the solubility of fortification salts.

The aim of the third chapter was to characterize the association status, to evaluate the binding capacity and to interpret the mechanism of interaction of CMP with CaCl_2 . The techniques used for this purpose were dynamic light scattering (DLS), dialysis, conductivity, solubility of CaCl_2 in ethanol in the presence of CMP, estimation of calcium binding through a selective ion electrode, obtaining a constant association and the maximum amount of calcium bound according to pH 7, 8 or 9. It can be concluded that a mol of CMP bonds very strongly a mol of calcium (ratio 1:1) with a K_{ass} of 2.103 L mol^{-1} . Possibly, this high affinity site is related to the CMP phosphorylated Ser. At higher calcium concentrations, each mol of CMP binds between 8 and 14 moles of calcium at low affinity sites and weakly bounds, with a K_{ass} between 30 and 130 L mol^{-1} depending on the pH (from 9 to 7).

Finally, in the fourth and final chapter the inhibition of the precipitation of calcium salts (CaCl_2 and CaCO_3) by CMP in an alkaline medium was evaluated simulating the pH and ionic strength of the intestine (phosphate buffer pH 8) and it was concluded that CMP is an effective calcium binder under basic conditions and that this property can be increased by a previous pH reversal treatment with citric, phosphoric and hydrochloric acids. On the other hand, the effect of CMP on the aqueous solubility of therapeutic salts (Ca_3Cit_2 and CaLac_2) was analyzed. The results indicated that the presence of CMP increased the solubility of both salts. This oversaturation effect is very interesting to optimize the bioaccessibility of dietary supplements that use these salts. Undoubtedly, CMP has enormous potential as a calcium binding peptide and can be used in both innovative foods and therapeutic supplements. These studies constitute a preliminary basis that would justify future investigations.

Keywords: caseinmacropeptide, calcium, calcium-binding peptides, bioaccessibility.

Fundamento del estudio. Según la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud de Argentina realizada en los años 2004-2005 en niños y mujeres entre 10 y 49 años (ENNYS, 2007), el calcio resultó uno de los nutrientes más críticos, con un 94,3% de mujeres que presentaron una ingesta menor a la ingesta diaria recomendada (IDR). En la Argentina, este requerimiento para la edad entre los 19 y 50 años es de 1.000 mg/día (FAO, 2001), independiente de su localización geográfica, situación socioeconómica o edad. En el caso de los niños menores de 2 años el 28% no cubrían la ingesta adecuada de este mineral, mientras que en el grupo de 2 a 5 años esta cifra llegó al 45,6%. Esos resultados evidencian que el **calcio** es uno de los nutrientes más críticos en mujeres y niños. Una dieta con aportes adecuados de calcio que esté biodisponible podría contribuir a controlar enfermedades causadas por la deficiencia de este elemento. El calcio no sólo debe estar presente en el alimento, sino que también debe ser absorbido por el organismo; una alternativa para aumentar su bioaccesibilidad podría ser incorporarlo junto con el caseinomacropéptido que además tiene numerosas propiedades bioactivas.

Esta tesis de doctorado se encuadra en el área de los alimentos funcionales y de la nanotecnología. En primer lugar, el hecho de trabajar con un componente bioactivo, como el CMP, resulta de gran interés tanto para la industria alimentaria que se interesa por brindar a los consumidores cada vez más productos que contengan ingredientes funcionales como para la industria farmacéutica que proporcionaría suplementos dietarios aumentando no solo la biodisponibilidad sino también la palatabilidad. Frente a la necesidad de mejorar la ingesta de calcio en la población, la fortificación de alimentos se convierte en una estrategia útil para mejorar la densidad nutricional de los alimentos en las dietas habituales.

El alcance de esta tesis comprende el estudio de la interacción del CMP a pH 7 y 3,5 (valores de pH encontrados en el tracto gastrointestinal) y sales de calcio comúnmente utilizadas tanto en la industria alimentaria como farmacéutica. También comprende la evaluación de su carácter ligante de calcio a través de diversas técnicas, hallando una relación óptima para la unión. Los resultados de esta tesis constituyen un aporte preliminar para estudios posteriores complejos como de biodisponibilidad a nivel intestinal, ensayos en animales y/o de desarrollo de un producto o bebida con CMP y calcio.

Algunos resultados de esta tesis fueron publicados en:

➤ **ARTICULOS PUBLICADOS EN REVISTAS CON REFERATO**

1- Publicación: LWT- Food Science and Technology (Impact Factor: 3,12)

Autores: Karina G. Loria, Jimena C. Aragón, Sofía M. Torregiani, Ana M.R Pilosof, María E. Farías

“Flow behaviour of caseinomacropéptide: Effect of particle size distribution, pH, concentration and temperature”

Editorial: Elsevier

Año: 2018 Volume 93 Pages 243–248 ISSN: 0023-6438.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.050>

2- Publicación: LWT- Food Science and Technology (Impact Factor: 3,12)

Autores: Karina G. Loria, Ana M.R Pilosof, María E. Farías

“Influence of calcium and sodium chloride on caseinomacropéptide self-assembly and flow behaviour at neutral pH”

Editorial: Elsevier

Año: 2018 Volume 98, Pages 598-605 ISSN: 0023-6438.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.029>

➤ **ARTICULOS PUBLICADOS EN REVISTAS SIN REFERATO**

1- 2016 Revista Tecnología Láctea Latinoamericana

“Un péptido obtenido del suero de queso podría aumentar la biodisponibilidad de calcio en los alimentos”

Autores: Loria K., Pilosof A.M.R y Farías M.E.

<http://publitec.com.ar/contenido/categorias/TLL95web.pdf>

Pág. 40-44, Año XXI, Volumen N° 95

ISSN 0328-4158

➤ **PUBLICACIONES EN LIBROS DE ACTAS DE CONGRESOS**

1- XVII Congreso CYTAL y XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe (CYTAL- ALACCTA 2019)

Trabajo completo aprobado aún no publicado:

“Asociación del CMP en presencia de calcio: efecto del anión acetato”

Autores: Loria, Karina G.; Pilosof, Ana M.R y Farías María E.

Lugar: Buenos Aires, Argentina. Fecha: 20 al 22 de Noviembre de 2019

ISBN: en trámite

2- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)

“Efecto de la presencia de NaCl y CaCl₂ sobre la dinámica de la gelificación, el color y la textura del caseinomacropéptido”

Autores: Loria, KG; Aragón, J.C.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E.

Análisis físico-químicos y sensoriales: Trabajos completos

ISBN 978-987-45380-5-5

Baroni [et al.]; compilado por Alberto Edel León. Pág. 293-302

Editado por Victoria Rosati; Carlos W. Robledo; Alberto Edel León. - 1a Ed compendiada.

Córdoba. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2017. Libro digital,

PDF <http://cicytac.cba.gov.ar/PDF/AnalisisFisico-QuimicosSensoriales.pdf>

3- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)
“Evaluación de la influencia del caseinomacropéptido en la biodisponibilidad de calcio: solubilidad en buffer fosfato”

Autores: Loria, K.G.; Aragón, J.C.; Torregiani, S; Gómez, G.A; Pighin, A; Pilosof, A.M.R y Farías, M.E

Análisis físico-químicos y sensoriales: Trabajos completos

ISBN 978-987-45380-5-5

Baroni [et al.]; compilado por Alberto Edel León. Pág. 285-289

Editado por Victoria Rosati; Carlos W. Robledo; Alberto Edel León. - 1a Ed compendiada. – Córdoba. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2017. Libro digital, PDF. <http://cicytac.cba.gov.ar/PDF/AnalisisFisico-QuimicosSensoriales.pdf>

4- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)
“Utilización de un electrodo de ion selectivo para la evaluación de la capacidad ligante de calcio del caseinomacropéptido”

Autores: Loria, KG; Aragón, J.C.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E.

Análisis físico-químicos y sensoriales: Trabajos completos

ISBN 978-987-45380-5-5

Pág. 280-284

Baroni [et al.]; compilado por Alberto Edel León.

Editado por Victoria Rosati; Carlos W. Robledo; Alberto Edel León. - 1a Ed compendiada. – Córdoba. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2017. Libro digital, PDF. URL:<http://cicytac.cba.gov.ar/PDF/AnalisisFisico-QuimicosSensoriales.pdf>

5- IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires (2017)
“El caseinomacropéptido que se obtiene del desecho de la quesería podría prevenir la deficiencia de calcio”

Autores: Loria, Karina G.; Pilosof, Ana M.R. y Farías, María E.

URL: <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/6717>

Lugar: Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes, Argentina Fecha: 1 de Septiembre de 2017

6- XVI CONGRESO CYTAL (2017)

Trabajo completo:

“Influencia de la distribución de tamaño de partícula, pH, concentración y temperatura en el comportamiento al flujo del caseinomacropéptido”

Autores: Loria, Karina G.; Aragón, Jimena C.; Torregiani, Sofía M.; Pilosof, Ana M.R y Farías María E.

Trabajo N°: 6.7 Sección Estructura de alimentos. Nanotecnología

Lugar: Mar del Plata, Argentina

Fecha: 18 al 20 de Septiembre de 2017. ISBN: 978-987-22165-8-0

➤ **PRESENTACIONES DE TRABAJOS EN REUNIONES CIENTÍFICAS**

1- INNOVA 2015. X CIBIA

Trabajo presentado en forma de póster: **“Un método alternativo para medir el autoensamblaje del caseinomacropéptido”**

Autores: Loria K. y Farías M. E.

ISSN: 2301-0819

Pág. 77 Lugar: Montevideo, Uruguay

Fecha: 7 al 9 de Octubre de 2015

2- INNOVA 2015. X CIBIA

Trabajo presentado en forma de póster: **“Comportamiento al flujo del caseinomacropéptido”**

Autores: Loria K.; Torregiani S.; Pilosof A.M.R y Farías M. E.

ISSN: 2301-0819. Pág. 89

Lugar: Montevideo, Uruguay.

Fecha: 7 al 9 de Octubre de 2015

3- XX Congreso Argentino de Nutrición. SAN 2015

Resumen presentado en forma de póster: **“Evaluación del caseinomacropéptido como ligante de calcio”**

Autores: Farías, María E., Loria, Karina; Torregiani, Sofía; Gómez, Gustavo; Pighin, Andrés y Pilosof, Ana M.R.

Lugar: Mar del Plata, Argentina

Fecha: 25 al 27 de Noviembre de 2015

Actualización en Nutrición volumen 16 Número especial XX Congreso Argentino de Nutrición. Pág 46

ISSN: 1667-8052

4- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)

Trabajo presentado en forma oral por Loria, K. **“Efecto de la presencia de NaCl y CaCl₂ sobre la dinámica de la gelificación, el color y la textura del caseinomacropéptido”**

Autores: Loria, KG; Aragón, J.C.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E.

Pag. 57

ISBN: 978-987-45380-0-0

Lugar: Córdoba, Argentina Fecha: 2 y 4 de Noviembre de 2016

5- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)

Trabajo presentado en forma de póster N° 104 **“Evaluación de la influencia del caseinomacropéptido en la biodisponibilidad de calcio: solubilidad en buffer fosfato”**

Autores: Loria, K.G.; Aragón, J.C, JC; TORREGIANI S; GÓMEZ, GA; PIGHIN A; PILOSOFF, AMR y FARÍAS, ME

ISBN: 978-987-45380-0-0

Lugar: Córdoba, Argentina Fecha: 2 y 4 de Noviembre de 2016

6- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016)

Trabajo presentado en forma de póster N° 197 “Utilización de un electrodo de ión selectivo para la evaluación de la capacidad ligante de calcio del caseinomacropéptido”

Autores: Loria, KG; Aragón, J.C.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E.

Pág: 249

ISBN: 978-987-45380-0-0

Lugar: Córdoba, Argentina Fecha: 2 y 4 de Noviembre de 2016

7- VII Conferencia Internacional de Proteínas y Coloides Alimentarios (CIPCA VII)

Trabajo presentado N° 31 en forma de oral por Loria, K. **“Influencia de las sales NaCl y CaCl₂ en la asociación molecular y las propiedades de flujo del caseinomacropéptido”**

Autores: Loria, KG; Aragón, J.C.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E.

Pág: 31

ISBN: <http://www.di.fcen.uba.ar/cipca/>

Lugar: Buenos Aires, Argentina Fecha: 29 al 31 de Mayo de 2017

8- VII Conferencia Internacional de Proteínas y Coloides Alimentarios (CIPCA VII)
Trabajo presentado N° 20 en forma de póster **“Efecto de la sonicación en la gelificación del caseinomacropéptido”**

Autores: Romero, F.; Loria, KG; Marchini, M.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E.

Pág: 65

ISBN: <http://www.di.fcen.uba.ar/cipca/>

Lugar: Buenos Aires, Argentina Fecha: 29 al 31 de Mayo de 2017

9- XVI CONGRESO CYTAL

Trabajo presentado en forma de póster: **“Influencia de la distribución de tamaño de partícula, pH, concentración y temperatura en el comportamiento al flujo del caseinomacropéptido”**

Autores: Loria, Karina G.; Aragón, Jimena C.; Torregiani, Sofía M.; Pilosof, Ana M.R y Farías María E.

Lugar: Mar del Plata, Argentina Fecha: 18 al 20 de Septiembre de 2017

ISBN: 978-987-22165-8-0 Resumen 6.7

10- VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018)

Trabajo presentado en formato póster **“Capacidad ligante de calcio del caseinomacropéptido mediante espectroscopia infrarroja”**

Autores: Loria, KG; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E. Resumen: 106

ISBN: 978-987-45380-9-3

Pág 806

Lugar: Córdoba, Argentina Fecha: 1 al 3 de Octubre de 2018

11- VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018)

Trabajo presentado en formato póster **“Efecto de la temperatura en la solubilidad del citrato de calcio en presencia de caseinomacropéptido”**

Autores: Loria, KG; Pissareff, E.; Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E. Resumen: 546

ISBN: 978-987-45380-9-3

Pág 319

Lugar: Córdoba, Argentina Fecha: 1 al 3 de Octubre de 2018

12- VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018)

Trabajo presentado en formato póster **“Reología de sistemas mixtos de almidón modificado, caseinomacropéptido y CaCl₂”**

Autores: Loria, KG; Romero, F., Pilosof, A.M.R. y Farías, M.E. Resumen: 612

ISBN: 978-987-45380-9-3

Pág 341

Lugar: Córdoba, Argentina Fecha: 1 al 3 de Octubre de 2018

13- XVII CONGRESO CYTAL y XXI CONGRESO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo presentado en formato póster: **“Asociación del CMP en presencia de calcio: efecto del anión acetato”**

Autores: Loria, Karina G.; Pilosof, Ana M.R y Farías María E.

Lugar: Buenos Aires, Argentina. Fecha: 20 al 22 de Noviembre de 2019

Agradecimientos

A la Dra. María Edith Farías, por haberme dado la oportunidad de dedicarme a lo que más me gusta que es la investigación, por su apoyo, su excelente disposición y sabiduría otorgada que hizo posible la realización de este doctorado y por sus consejos incondicionales durante toda esta etapa.

A la Dra. Ana María Pilosof por todo su apoyo profesional y colaboración durante esta etapa de doctorado y por su gran contribución en mi formación académica.

A mis padres Lucas y Graciela, por enseñarme a amar la vida y acompañarme en cada escalón de la misma y en particular por su gran ayuda para llevar a cabo mi educación desde el principio. A mi hermano Lucas, por su apoyo incondicional y eterno.

A Guille, por su amor y paciencia en la realización y escritura de este trabajo y sobretodo y lo más importante, por hacerme comenzar y terminar cada día con una sonrisa.

Al equipo de investigación, por su colaboración, compañerismo y compartir cada día en mi segundo hogar: Jimena, Sofía, Ezequiel, Virginia, Rocío, Malena, Emilia, Eliana y Fátima.

A mis compañeros de laboratorio, por su compañerismo: Cecilia, Daniela, Gabriela, Alicia, Marcelo, Paula, y a todo el equipo.

A mis compañeros de la asignatura Transformación de Leche I y II: Laura, Mariano, Sofia y Claudia, que me permitieron ser parte del equipo de docencia, recibéndome con alegría desde el primer día y con quienes hemos compartido numerosas anécdotas y buenos momentos.

Al personal del laboratorio central por su asistencia: Claudia, Belén, Gustavo, Emiliano y Víctor, a quienes he molestado en varias ocasiones.

A Nelsi Ramos, por iniciarme en el camino de la investigación cuando era alumna de Ing. en alimentos.

A Eduardo Rustoy, de química orgánica, por enseñarme a utilizar la técnica de medición de la espectroscopía FTIR que ha sido muy importante para el desarrollo de este trabajo.

A Gabriela y María Eugenia del laboratorio de inmunología, por ayudarme con algunas técnicas.

A Silvina Ríos y el equipo de Nutrición por su ayuda en la realización de los ensayos de composición nutricional del CMP en su laboratorio.

A la Universidad Nacional de Luján y al Departamento de Tecnología por haberme dado la posibilidad de tener un lugar de trabajo, y por el apoyo de las autoridades para poder realizar el doctorado.

A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) por haberme brindado la posibilidad de realizar este doctorado a través del otorgamiento de las becas doctorales a lo largo de estos 5 años.

A todos, sinceramente. ¡Muchas gracias!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El calcio	4
1.1. Importancia del calcio	4
1.2. El calcio en los alimentos	5
1.3. Biodisponibilidad y Absorción	7
1.4. Metabolismo	8
1.5. Enfermedades relacionadas con el calcio	10
1.6. Uso terapéutico y en alimentos de las sales de calcio de uso frecuente	12
2. Caseinomacropéptido	16
2.1. Estructura del caseinomacropéptido	17
2.2. Glicosilación y Fosforilación	19
2.3. Autoensamblaje	21
2.4. Propiedades Bioactivas	24
2.5. Propiedades Funcionales	27
2.6. Motivación para utilizar el CMP como potencial ligante de calcio	29
3. Referencias	31
OBJETIVOS	38
Objetivo general	39
Objetivos específicos	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
1. Materiales	41
1.1. Caseinomacropéptido (CMP)	41
1.1.1. Determinación de la composición nutricional del CMP	41

1.2. Sales de calcio	46
1.3. Preparación de las soluciones	47
2. Métodos.....	48
2.1. Medición de pH	48
2.2. Mediciones reológicas.....	48
2.3. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	52
2.4. Colorimetría.....	55
2.5. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	56
2.6. Test de inclinación o “tilting test”	60
2.7. Textura de los geles	61
2.8. Determinación de la fracción no dializable de calcio	64
2.9. Espectroscopia por Absorción Atómica (EAA)	65
2.10. Medición de conductividad	66
2.11. Determinación del calcio por electrodo de ion selectivo.....	67
2.12. Reversibilidad de las soluciones de CMP por pH.....	69
2.13. Solubilidad de calcio en buffer fosfato en presencia de CMP	70
2.14. Solubilidad de CaCl_2 en etanol en presencia de CMP.....	73
2.15. Inhibición de la precipitación de hidroxycarboxilatos de calcio (Ca_3Cit_2 y CaLac_2) por el CMP	74
2.16. Análisis estadístico.....	78
3. Referencias	79
RESULTADOS.....	81
CAPÍTULO 1: Interacción CMP/calcio a pH neutro	83
Sección I (Nivel Macroscópico).....	84
I.1. Caracterización del comportamiento de flujo del CMP a pH neutro	86
I.1.1. Efecto de la concentración.....	86
I.1.2. Efecto del entorno de pH (entre 5,0 y 9,0)	91
I.1.3. Efecto de la temperatura.....	91
I.1.4. Conclusiones parciales	94

I.2. Caracterización del comportamiento de flujo del CMP en presencia de CaCl_2 a pH neutro.....	95
I.2.1. Efecto de la adición de CaCl_2 sobre el comportamiento de flujo del CMP.....	96
I.2.2. Efecto de la adición de CaCl_2 sobre el pH de las soluciones de CMP	99
I.2.3. Efecto de la temperatura sobre el comportamiento de flujo de soluciones de CMP y CaCl_2	100
I.2.4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las soluciones de CMP y CaCl_2	101
I.3. Caracterización del comportamiento de flujo del CMP en presencia de CaAc_2 a pH neutro.....	104
I.3.1. Efecto de la adición de CaAc_2 sobre el comportamiento de flujo del CMP	105
I.3.2. Efecto de la adición de CaAc_2 sobre el pH de las soluciones de CMP ...	108
I.3.3. Efecto de la temperatura sobre el comportamiento de flujo de soluciones de CMP y CaAc_2	109
I.3.4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las soluciones de CMP y CaAc_2	109
I.4. Discusión y Conclusión de la Sección I	111
Referencias	113
Sección II (Nivel Molecular)	115
II.1. Caracterización de la asociación molecular del CMP a pH neutro.....	117
II.1.1. Efecto de la concentración sobre el estado de asociación del CMP.....	117
II.1.2. Efecto del entorno de pH (entre 5,0 y 9,0) y la temperatura	120
II.1.3. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier del CMP a pH neutro..	121
II.1.4. Conclusiones parciales.....	123
II.2. Caracterización de la asociación molecular del CMP en presencia de CaCl_2 a pH neutro.....	124
II.2.1. Efecto de la adición de CaCl_2 sobre la asociación del CMP por DLS....	124
II.2.2. Espectro FTIR del CMP a pH neutro en presencia de CaCl_2	127
II.2.3. Conclusiones parciales.....	130

II.3. Caracterización de la asociación molecular del CMP en presencia de CaAc_2 a pH neutro.....	131
II.3.1. Efecto de la adición de CaAc_2 sobre la asociación del CMP por DLS.....	131
II.3.2. Espectro FTIR del CMP a pH neutro en presencia de CaAc_2	133
II.4. Discusión y Conclusión de la Sección II.....	135
Conclusiones generales del Capítulo 1.....	136
Referencias	137
CAPÍTULO 2: Interacción CMP/calcio a pH 3,5.....	139
1. Gelificación del CMP a pH 3,5 en presencia de CaCl_2 o CaAc_2	141
1.1. Efecto del CaCl_2	142
1.1.1. Transición sol-gel.....	142
1.1.2. Dinámica de gelificación	143
1.2. Efecto del CaAc_2	149
1.2.1. Dinámica de gelificación	149
1.3. Conclusiones parciales.....	150
2. Propiedades de los geles de CMP en presencia de CaCl_2 o CaAc_2	151
2.1. Pequeñas deformaciones: barridos de frecuencia	152
2.1.1. CMP/ CaCl_2	152
2.1.2. CMP/ CaAc_2	155
2.2. Parámetros del color	156
2.3. Parámetros de textura.....	160
2.4. Conclusiones parciales.....	161
3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	163
3.1. Comparación del espectro FTIR del CMP a pH 3,5 y 7,0.....	163
3.2. CMP/ CaCl_2	165
3.3. CMP/ CaAc_2	167
Conclusiones generales del Capítulo 2	168
Referencias.....	169
CAPÍTULO 3: Estudio de la capacidad ligante.....	171
1. Estudio del mecanismo de interacción entre el CMP y el calcio por DLS.....	174

2. Determinación de la capacidad ligante de calcio del CMP	177
2.1. Diálisis.....	177
2.2. Conductimetría.....	178
2.3. Solubilidad de CaCl_2 en etanol en presencia de CMP.....	182
2.4. Isotermas de unión de Ca^{2+}	184
Conclusiones generales del Capítulo 3	191
Anexo I	192
Referencias	195
CAPÍTULO 4: Inhibición de la precipitación de sales de calcio por el CMP..	197
1. Inhibición de la precipitación de sales de calcio por el CMP en buffer fosfato.....	200
2. Inhibición de la precipitación de hidroxicarboxilatos de calcio (Ca_3Cit_2 y CaLac_2) por el CMP	209
2.1. Ca_3Cit_2	210
2.2. CaLac_2	214
Conclusiones generales del Capítulo 4	218
Referencias	219
CONCLUSIONES GENERALES	221

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Se define a un alimento como “toda sustancia natural o procesada que se ingiere con el fin de satisfacer la incorporación de los nutrientes para el mantenimiento de las funciones vitales del organismo” (ANMAT, 2012). Satisfacer las necesidades nutricionales es la principal función de la dieta, pero en la actualidad los consumidores están más informados e interesados en conocer la relación existente entre la dieta y la salud, buscando llevar un estilo de vida sano para reducir el riesgo de padecer enfermedades y dolencias. Enfermedades como diabetes, cáncer, fallas cardíacas, alergias, osteoporosis, problemas dentales y obesidad están claramente asociadas a los hábitos alimentarios, concernientes tanto a adultos como a niños (Illanes y Guerrero, 2016).

Los minerales esenciales son sustancias orgánicas requeridas por el cuerpo para una variedad de funciones. Su clasificación desde el punto de vista nutricional se puede realizar en función de la cantidad en que están presentes en el organismo (Portela, 2015). Se distinguen así los macronutrientes o elementos mayores, grupo constituido por calcio, sodio, fósforo, potasio, cloruro y magnesio, y los micronutrientes minerales o elementos menores que comprenden al yodo, cobre, zinc, hierro, selenio y molibdeno. Actualmente, ambas categorías de minerales esenciales han adquirido importancia nutricional, tanto por sus consumos deficientes como por los excesivos, y por su relación con enfermedades crónicas como la hipertensión, accidentes cerebro vasculares, osteoporosis, anemia ferropénica, bocio, entre otras. Se debe tener en cuenta que la cantidad de nutrientes de un alimento determinada por métodos químicos convencionales no siempre indica la utilización por el organismo ya que los nutrientes no existen aislados en el alimento y están sujetos a interacciones con otros nutrientes o componentes de la matriz alimentaria. El concepto de biodisponibilidad se define como *“la proporción del nutriente ingerido que puede ser digerido, absorbido y metabolizado o utilizado por el organismo para los fines que le son propios”* (Portela, 2015). Para los minerales, el concepto de biodisponibilidad implica que éstos deben encontrarse en forma soluble al pH del tracto gastrointestinal donde se realiza su absorción mineral. Los ligandos capaces de formar complejos solubles y absorbibles incrementan la biodisponibilidad mineral (Portela, 2015).

El calcio es un nutriente esencial en el cuerpo humano. Se han realizado numerosos estudios para la utilización de péptidos de cadena corta como ligantes de calcio como medio de suplementación de este mineral (Ferraretto y col., 2001; Phelan y col., 2009; Zong y col., 2012; Charoenphun y col., 2013; Chen y col., 2014; Eckert y col., 2014; Peng y col., 2017; Wang y col., 2017; Wang y col., 2018; Chen y col., 2019; Zhang y col., 2019). Estos péptidos podrían ligar calcio a través de grupos específicos, como los grupos fosfatos o los grupos carboxilatos (Sun y col., 2016).

El Caseinomacropéptido (CMP) es un péptido de origen animal, que proviene del suero de queso luego de la escisión de la κ -caseína por vía enzimática y posee numerosas propiedades bioactivas. Hasta el momento, no existe en la literatura información sobre mezclas de CMP con sales de calcio, por lo cual, teniendo en cuenta sus propiedades funcionales y las características bioactivas del CMP, resulta de gran interés su estudio para el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales. La motivación para usar al CMP como péptido ligante de calcio está basada en cuatro consideraciones principales: su alto contenido de ácido siálico (Nakano y Ozimek, 1999), su cadena peptídica rica en Glu y Asp (Thöma-Worringer y col., 2007), su alta carga negativa que le confiere solubilidad a pH superior a 4,5 y las importantes propiedades biológicas del CMP (Brody, 2000). Estudiar nuevas aplicaciones del CMP, que se obtiene del suero de quesería, es una manera de revalorizar al suero de queso que está considerado como GRAS (sustancias generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas del inglés “generally recognized as safe”) por el Departamento de Administración de Alimentos de Estados Unidos (USFDA).

1. CALCIO

1.1. Importancia del calcio

El organismo humano adulto contiene entre 850 y 1500 g de calcio, que representan alrededor del 1,7% del peso corporal, y es el mineral más abundante en nuestro organismo. El 99% está localizado en el tejido óseo, formando con el fósforo un fosfato complejo, la hidroxapatita, depositada sobre una matriz de naturaleza proteica y el 1% restante se encuentra en circulación sanguínea, fluidos y tejidos blandos (Portela, 2015). El calcio del organismo cumple importantes funciones esqueléticas y reguladoras, por ejemplo, la constitución de fluidos y tejidos, la regulación cardíaca y la contracción muscular, la conducción neuronal y el mantenimiento de la estructura y calidad de la masa ósea. Además, como componente de los sistemas enzimáticos, es estimulante de la secreción hormonal, la proliferación celular y la coagulación sanguínea. Su depósito depende de varios factores como la ingesta dietética, la absorción intestinal, la excreción renal y el remodelamiento óseo.

El requerimiento de calcio está afectado por diversos factores como edad, sexo, embarazo, lactancia o enfermedades como por ejemplo la insuficiencia renal. En Argentina, el requerimiento recomendado de calcio para la edad entre los 19 y 50 años es de 1000 mg/día (FAO, 2001). El criterio actualmente utilizado para establecer las necesidades de calcio se basa en alcanzar y luego conservar un adecuado pico de masa ósea (o meseta) (PMO), es decir, lograr la adquisición máxima del mineral al finalizar el crecimiento. Luego, a lo largo de la vida se mantiene con pocos cambios hasta que, a partir de los 50 años, el PMO comienza a declinar, más rápidamente en la mujer que en el hombre, deteriorando la resistencia de los huesos y aumentando el riesgo de fracturas (osteoporosis) (Portela, 2015). Es por ello, que el National Institute of Health (NIH) recomienda una ingesta superior (1.500 mg/día) a partir de esa edad. Durante el embarazo se produce un paso activo de calcio de la madre al feto a través de la placenta, que es necesario para la formación del esqueleto. Para evitar un desgaste excesivo de las reservas de la madre es imprescindible asegurar un correcto aporte de este mineral en la dieta (1200 mg/día). Se estima que las necesidades de calcio en la mujer lactante son de unos 1.000 mg/día y en los adolescentes 1.300 mg/día (FAO, 2001). El calcio es, entonces, fundamental para que se produzca un óptimo crecimiento óseo y para que

se mantengan las funciones vitales en las que participa el calcio plasmático. Además, una ingesta adecuada podría prevenir la aparición de osteoporosis, obesidad e hipertensión (Lee Gallagher, 2009).

1.2. El calcio en los alimentos

Conocer las fuentes de calcio dietario es el primer paso para incrementar su ingesta. Es un elemento vital para el organismo y su existencia en él depende exclusivamente del consumo en la dieta. Los principales aportadores son los lácteos (la leche, el yogurt y el queso) que por su elevado contenido de calcio y por su fácil absorción constituyen la principal fuente de este mineral. El calcio ingerido a través de los productos lácteos tiene un efecto de mayor importancia sobre la mineralización ósea y además favorece el desarrollo de una buena salud dental (Riechman, 2005). Otras fuentes de calcio son algunas hortalizas de hojas verdes tales como acelga y espinaca, brócoli, pescados que se consumen con espinas (caballa, cornalitos y sardinas) y algunas semillas tales como almendras y sésamo (López, 2005).

El calcio interacciona fuertemente con los demás componentes de la dieta en el intestino y en consecuencia compuestos como fitatos (presentes en cereales, frijoles y semillas comestibles), oxalatos (presentes en hojas verdes de vegetales, como acelga y espinaca), ácidos grasos de cadena larga, fluoruros, fosfatos y ciertas fibras disminuyen su absorción y reducen su biodisponibilidad por la formación de complejos de calcio insolubles. El ácido oxálico es el inhibidor más potente de la absorción del Ca^{2+} , ya que forma oxalato de calcio que es un compuesto insoluble (Heaney, 1998). El fitato también es un inhibidor de la absorción por la formación de quelatos insolubles. Este efecto inhibidor disminuye cuando los cereales se panifican debido a que el ácido fítico es degradado por la enzima fitasa de las levaduras fermentadoras (Hallberg, 2000). El fósforo es necesario en los períodos de rápido crecimiento óseo, pero debe estar en proporciones balanceadas con el Ca^{2+} . Una elevada relación calcio/fósforo dificulta la biodisponibilidad del calcio al formar complejos insolubles. Las bebidas colas son ricas en fósforo debido a su contenido en ácido fosfórico utilizado como acidulante. La ingestión excesiva de fosfatos a través de estas bebidas, no permitiría alcanzar el pico de masa ósea esperado (Wyshak, 2000). El criterio conocido para considerar un alimento como buena fuente

de calcio es que proporcione al menos 30 mg de calcio absorbible por una porción estándar o por cada 100 kcal de alimento (Titchenal, 2007). Según el Centro de Estudios sobre Nutrición Infantil (CESNI) consumir un vaso de leche o yogur contiene la misma cantidad de calcio que 300 g de brócoli, 130 g de almendras, 65 g de sardinas, anchoas, cornalitos o 280 g de sésamo, alimentos que son más costosos, de baja biodisponibilidad y difíciles de consumir en esa cantidad. Es por ello que los lácteos constituyen una fuente de calcio por excelencia (López, 2005). La **Figura 1** relaciona la cantidad de calcio por porción de diversos alimentos comunes. Puede observarse que la leche y sus derivados tienen mayor contenido de calcio por porción.

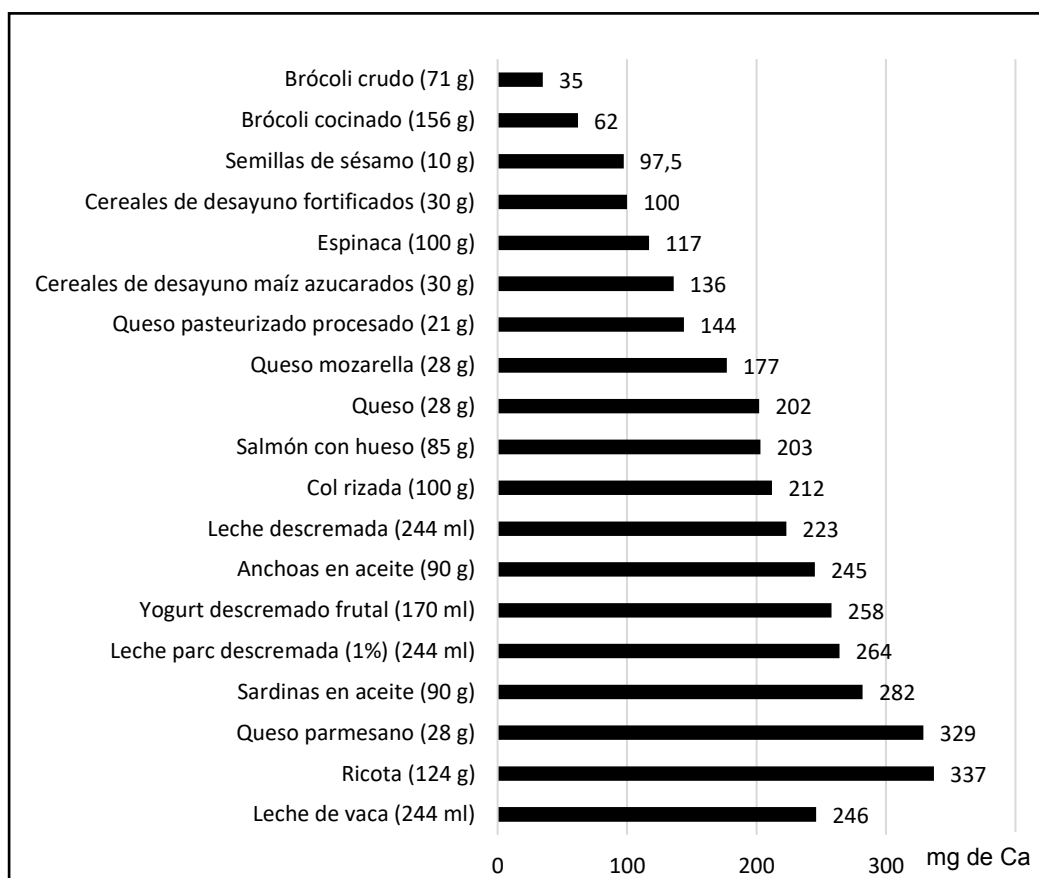


Figura 1. Contenido aproximado de calcio por porción de algunos alimentos comunes. Elaboración propia con datos obtenidos de la Sociedad Argentina de Pediatría (Fernández, 2011).

1.3. Biodisponibilidad y Absorción

La biodisponibilidad de los minerales depende de factores intrínsecos del individuo, como el sexo, la edad, la genética, la etapa de desarrollo, el estado fisiológico y nutricional y el estado de salud general. Pero también depende de factores extrínsecos, como la cantidad de nutrientes ingeridos por día, de sus propiedades fisicoquímicas (pH, solubilidad, estado de oxidación, quelación, complejación) y de las interacciones con otros nutrientes o elementos provenientes de la dieta (Quintero Gutierrez, 2002).

El calcio que está presente en los alimentos que ingerimos se encuentra en forma de sales o combinado con otros nutrientes y necesita de la presencia del ácido clorhídrico del estómago para disolverse o mantenerse en solución durante el tránsito intestinal de pH neutro o ligeramente alcalino (Gueguen, 2000). El 90% de la absorción del calcio tiene lugar en el intestino delgado (Wasserman, 2004) a través de su forma ionizada (Ca^{2+}) o unido a una molécula orgánica soluble (Gueguen, 2000). La absorción del calcio en el estómago representa una fracción muy menor y el calcio restante (menos del 10%) se absorbe en el colon (Vavrusova y col., 2014). El nivel de absorción es bajo por varios factores, como se mencionó anteriormente, interacciona con los demás componentes de la dieta formando complejos insolubles. Otro factor es la difícil absorción de cationes divalentes (como el calcio o el magnesio) en la mucosa intestinal y además las sales de calcio en las condiciones del intestino (pH 7 a 8,5) son insolubles (Eckert y col., 2014). Otros factores que limitan la absorción de calcio son la deficiencia en vitamina D, una inadecuada relación calcio/fósforo (la correcta es 2:1), el exceso de sodio y el consumo de café mayor a 90 mg/día (Fernández, 2011).

La absorción de calcio también varía a lo largo del ciclo de la vida, siendo la etapa de lactancia el período de mayor absorción, con un porcentaje que ronda un 55-60%, en la adolescencia estos valores descienden a 35-40%, y se estabiliza en un 30% aproximadamente en la etapa adulta. A partir de los 50 años, la eficiencia de absorción declina casi 0,2% por año, con un porcentaje adicional del 2% en la menopausia (Torresani, 2007).

1.4. Metabolismo

El metabolismo u homeostasis del calcio es el mecanismo por el cual el organismo mantiene adecuados niveles de calcio. Los valores normales de este mineral en plasma varían de 9 a 11 mg% (López, 2005). El calcio de los alimentos es ionizado en el medio ácido del estómago y en el intestino interacciona con los demás componentes de la dieta. Según las características químicas de la matriz alimentaria y el pH intestinal se forman complejos con el calcio cuya solubilidad depende su absorción (Portela, 2015).

El calcio es absorbido en el intestino delgado por dos mecanismos: uno saturable, que predomina en el duodeno proximal, y otro no saturable, que tiene lugar en el intestino delgado (Portela, 2015) (**Figura 2**).

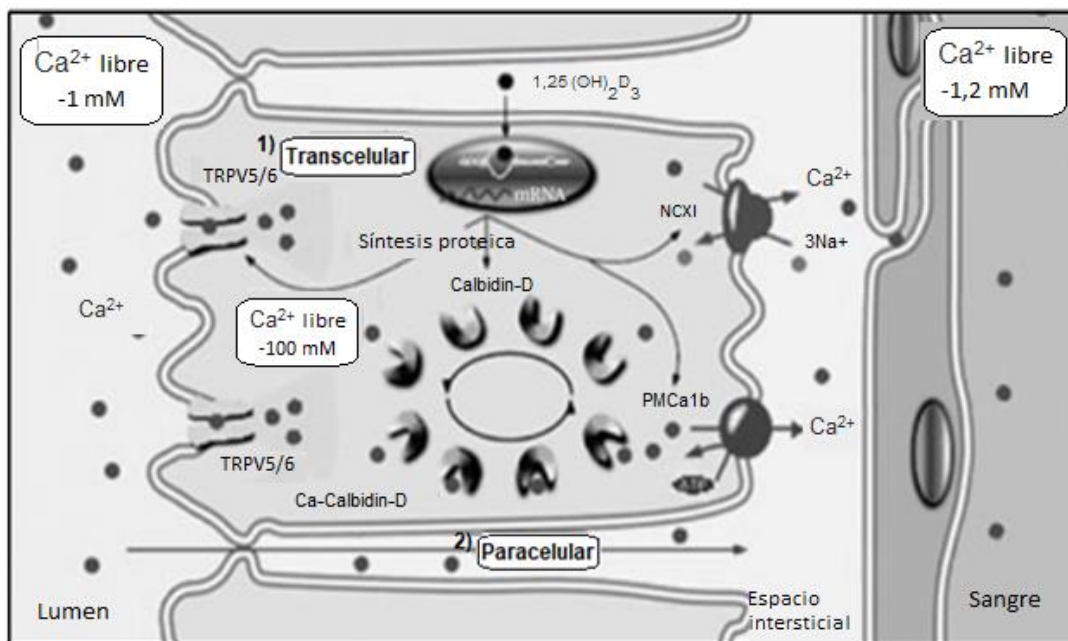


Figura 2. El Ca^{2+} ionizado se absorbe a través del epitelio intestinal por dos mecanismos de transporte: **1) transcelular**, activo, controlado metabólicamente por la vitamina D y **2) paracelular**, pasivo, no saturable, a través de las uniones herméticas entre las células e impulsado tan solo por el gradiente electroquímico de Ca^{2+} . Adaptado de Quesada Gómez (2011).

El mecanismo no saturable es independiente del estado nutricional y de la actividad de la vitamina D; predomina en el yeyuno e íleon y se realiza por un mecanismo *paracelular*, o sea, entre la unión de las células enterales.

El mecanismo saturable o *transcelular*, se lleva a cabo fundamentalmente en el duodeno y yeyuno proximal, está regulado fisiológica y nutricionalmente por el metabolismo activo de la vitamina D, y consta de 3 etapas:

- I. Entrada del calcio desde el lumen a las células intestinales a través de canales de calcio especializados (TRPV5 y TRPV6), localizados en la membrana de borde en cepillo (BBM).
- II. Difusión intracelular hacia la membrana basal, mediado por proteínas específicas (Calbindina-D), cuya síntesis es inducida a nivel genómico por la acción transcripcional del derivado activo de la vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o calcitriol) y la cual tiene una alta afinidad por el Ca^{2+} .
- III. Extrusión del calcio al sistema vascular, mediado por la Ca-ATPasa y el *anti-porter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localizados en la membrana basolateral (BLM).

De esta forma, se produce la absorción neta de Ca^{2+} desde el lumen intestinal hasta el compartimiento extracelular.

Cuando el aporte de Ca^{2+} es suficiente, se inhibe la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y se satura el transporte *transcelular*, por lo cual el mecanismo de absorción *paracelular* pasa a ser el predominante. Por el contrario, cuando el aporte de Ca^{2+} es limitado el *transcelular* es el predominante. Si se aporta un tipo de sal poco soluble y ionizable en cantidades elevadas, puede ser suficiente para saturar el mecanismo *transcelular*, pero no suficiente para potenciar de un modo significativo el transporte *paracelular*. Sin embargo, si se administra un alimento o una sal cálcica soluble e ionizable, una vez saturado el proceso *transcelular*, el calcio puede continuar absorbiéndose mediante el mecanismo *paracelular* (Quesada Gómez, 2011).

1.5. Enfermedades relacionadas con el calcio

La deficiencia crónica de calcio ocasiona en el hombre adulto osteoporosis, patología en la cual disminuye el contenido mineral del hueso aumentando la susceptibilidad a las fracturas, especialmente en las muñecas, la columna vertebral y las caderas (López, 2005). Cabe señalar que sobreviene la muerte en un plazo de 6 meses después de la fractura de cadera en el 15-20% de los pacientes, con morbilidad importante en los sobrevivientes (Mota-Blancas, 1999). La osteoporosis puede afectar a ambos sexos, pero las mujeres son más vulnerables a la enfermedad debido a una aceleración de la pérdida ósea después de la menopausia (Miladi y col., 2013). Afecta estimadamente a 75 millones de personas en todo el mundo (Vavrusova y col., 2014) y es considerada una epidemia oculta.

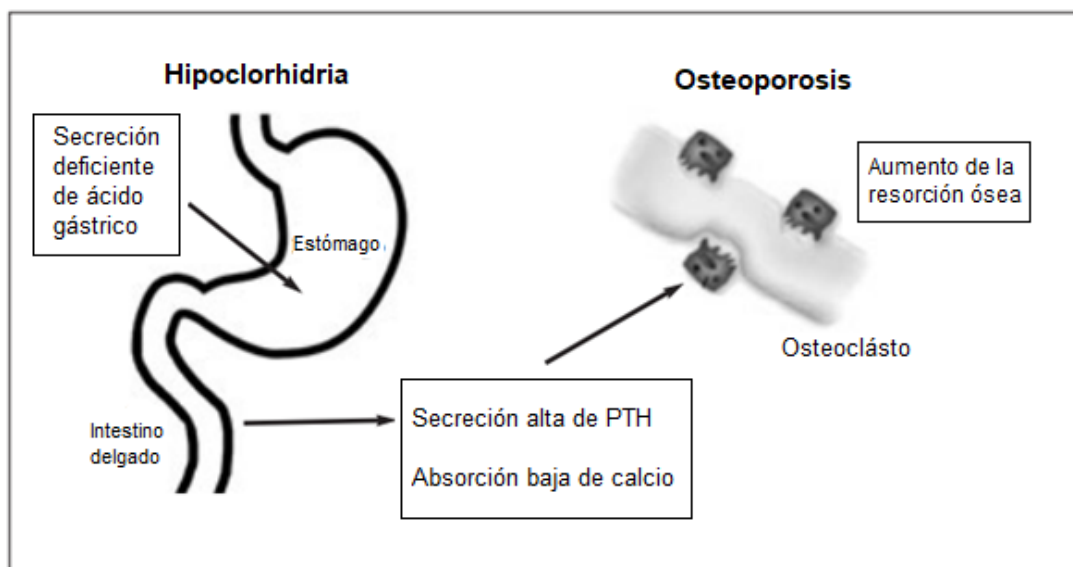


Figura 3. El calcio de los alimentos se absorbe mayoritariamente en el intestino delgado, bajo influencia de la vitamina D. Para su absorción necesita disolverse y ionizarse en el estómago y duodeno proximal, por la acción del ácido clorhídrico del estómago. La hipoclorhidria disminuye la ionización del calcio, y por tanto su disponibilidad para ser absorbido. La hipocalcemia resultante incrementa la secreción de hormona paratiroidea (PTH), que aumenta la resorción ósea y contribuye al desarrollo de osteoporosis (Quesada Gómez, 2011).

En los ancianos disminuye la biodisponibilidad del calcio por la hipoclorhidria y la aclorhidria que son los trastornos generados por el decrecimiento de la secreción de ácido gástrico en el estómago, y la falta de la misma, respectivamente. Esta condición disminuye la disolución de las sales de calcio en agua en el estómago y

contribuye a la mala absorción de calcio ya que circula por los intestinos en forma de sales insolubles no asimilables (Straub, 2007). La **Figura 3** muestra la relación entre la hipoclorhidria y la osteoporosis.

En la Insuficiencia Renal Crónica (IRC) se aconseja la administración de una dieta equilibrada adaptada a la edad y sexo que cubra los requerimientos de calcio en cantidades adecuadas a las recomendaciones. Los pacientes afectados con IRC no dializados requieren entre 600 y 1400 mg/día de calcio, que será aportado por la dieta y los suplementos orales, mientras que los pacientes que se encuentran en diálisis crónica suelen requerir entre 1200 y 1600 mg/día de calcio para lograr un balance positivo o neutro. La recomendación actual para los pacientes afectados con IRC es la de proporcionar una ingesta diaria de calcio total (dieta y complementos) que no supere los 2000 mg/día de calcio para evitar una sobrecarga que condicione la aparición de calcificaciones cardio-vasculares (Douthat y col., 2009). Al disminuir la función renal se produce una acumulación corporal de fósforo en forma directamente proporcional a la cantidad ingerida en los alimentos. La hiperfosfatemia inhibe la actividad de la hidroxilasa renal, disminuyendo la producción de calcitriol y de esta manera, en forma indirecta a la hipocalcemia por menor absorción intestinal de calcio. Entre las medidas más importantes, el control de la hiperfosfatemia requiere disminuir el ingreso de fosfato (dieta, captores orales de fosfato) e incrementar las pérdidas (diálisis). Para disminuir la ingesta de fosfato es necesario que los pacientes con IRC tengan una dieta equilibrada. Además, es necesario que se disminuya la absorción intestinal del fosfato ingerido, por este motivo se recomienda la ingesta de suplementos de calcio. Entre los más utilizados se encuentran el carbonato de calcio y el acetato de calcio. Ambas sales han demostrado ser eficaces cuando se los utiliza en altas dosis y tienen un costo relativamente bajo de tratamiento. Ambos medicamentos son más efectivos si se administran durante las comidas. Su principal limitación es el riesgo de producir hipercalcemia (elevación de los niveles de calcio total por encima de 10,5 mg/dL), la escasa tolerancia digestiva y la escasa palatabilidad (estas sales son ingeridas en forma de tabletas poco agradables y de gran tamaño).

La Hipertensión, la Hipertensión Inducida por el Embarazo (HIE) y el cáncer de colon son otras enfermedades que se han documentado como relacionadas a la baja ingesta de calcio (Portela, 2015).

1.6. Uso terapéutico y en alimentos de las sales de calcio de uso más frecuente

El metabolismo, la biodisponibilidad y el uso terapéutico de las diferentes formulaciones de calcio varían significativamente según la sal empleada. Las sales de uso más frecuente (carbonato, citrato, gluconato, fosfato y lactato) aportan diferentes cantidades de calcio elemental. Los usos más habituales de estas sales de calcio son el tratamiento y la prevención de la osteoporosis; en osteopenia; en estados de hipocalcemia, por bajo aporte o mala absorción; como suplemento dietario, según la ingesta diaria recomendada y también, en enfermedades vasculares, como en las hemorroides internas, las flebopatías y en la retinopatía diabética (Sosa, 2009).

- Carbonato de calcio: Es el suplemento más utilizado y menos costoso. La sal reacciona con el ácido clorhídrico del estómago formando cloruro de calcio. Una proporción variable del ion calcio es liberada y absorbida por el intestino, pero cerca del 85 % es reconvertido a sales de calcio insolubles (Buckley, 1989). Un aporte de 1000 mg de carbonato de calcio sólo proporciona 400 mg de calcio elemental y, de estos últimos, el intestino sólo absorberá aproximadamente el 28 % (112 mg). El carbonato de calcio es la sal de primera elección para tratar la hiperfosfatemia, es fijador de fosfatos por formación de complejos insolubles en el tracto gastrointestinal y, así, se reduce la absorción de fosfatos (Beers, 1999). También es utilizado como coadyuvante en el tratamiento de la osteoporosis y habitualmente como suplemento en los estados de deficiencia.
- Citrato de calcio: El citrato de calcio tiene mayor biodisponibilidad que el carbonato, cuando es consumido con las comidas (Recker, 1985). El carbonato de calcio depende del ácido gástrico para convertir el ion calcio en biodisponible. Las personas que padecen aclorhidria, piloroplastia u otras patologías en las que el compuesto de calcio no permanece en medio ácido el tiempo suficiente como para liberar el mismo, no lo absorben adecuadamente. En cambio, el citrato de calcio, permanece en forma soluble en el medio alcalino del intestino delgado. En individuos con secreción normal de ácido gástrico, de un 20 a un 66 % más de calcio está biodisponible a partir del

citrato con respecto al carbonato y, en personas con aclorhidria, resulta ser un 100 % más biodisponible (Gennaro, 1998). El citrato de calcio se usa para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis, las carencias de calcio en los períodos de crecimiento, el embarazo, la lactancia y por dietas insuficientes, especialmente destinado a los pacientes con hipoclorhidria o aclorhidria orgánica o farmacológica.

- Gluconato de Calcio: Puede administrarse por vía oral, inyección intramuscular o intravenosa, aunque las inyecciones intramusculares pueden causar abscesos. En general, el gluconato de calcio se considera la sal de calcio de elección para uso intravenoso (Gennaro, 1998). Como libera sólo un 9 % de calcio elemental, debe emplearse varias veces al día.
- Fosfato de Calcio: Es una buena fuente de calcio y fósforo durante el embarazo, la lactancia o la hipocalcemia de leve a moderada. Debido al contenido de fosfato está contraindicada en el hipoparatiroidismo (Gennaro, 1998). Tiene mejor biodisponibilidad que el lactato de calcio y que el carbonato de calcio, probablemente debido a que el Ca y el P son los constituyentes más requeridos en la formación del hueso. El fosfato de calcio tribásico libera un 39 % de calcio elemental y hay formulaciones que mejoran su biodisponibilidad porque contienen vitamina D.
- Lactato de Calcio: Esta sal no debe emplearse en casos de intolerancia a la lactosa (insuficiencia de lactasa); se administra en forma oral y parenteral. Los comprimidos que contienen lactato de calcio no producen irritación gastrointestinal y, en el caso de la vía intravenosa, corrigen en forma rápida la hipocalcemia. Es una excelente fuente de ion calcio para el tratamiento oral de sus deficiencias y para la prevención de la osteoporosis. Como la biodisponibilidad del calcio no depende del ácido gástrico, como en el caso del carbonato, el lactato es más aconsejable, en especial, para los pacientes mayores. El lactato de calcio también está disponible en combinación con el glicerofosfato en forma inyectable.

Tabla 1. Características importantes de las fuentes de calcio comúnmente utilizadas en la industria alimentaria. Adaptada de Gerhard (2002).

Producto	Solubilidad del calcio a 25°C (g/L)	Sabor	Contenido de calcio (%)
Carbonato de calcio	Insoluble	Untuoso, alimonado	40
Fosfato de calcio	Insoluble	Arenoso, suavemente dulce	17 – 38
Citrato tricálcico (4 H ₂ O)	0,2	Neutral	21
Lactato de calcio (5 H ₂ O)	9,3	Suavemente dulce	13
Lactato-gluconato de calcio	45 - 50	Neutral	10 – 13
Gluconato de calcio	3,5	Suave, neutral	9

La fortificación de los alimentos puede ser una estrategia para controlar la carencia de nutrientes (FAO, 2002). Usualmente, los términos fortificación y enriquecimiento son usados como sinónimos, pero no lo son. Al hablar de Alimentos Enriquecidos, el Código Alimentario Argentino los define en su capítulo XVII, art. 1369, como *“aquellos a los que se han adicionado nutrientes esenciales (vitaminas y/o minerales y/o proteínas y/o aminoácidos esenciales y/o ácidos grasos esenciales) con el objeto de resolver deficiencias de la alimentación que se traducen en fenómenos de carencia colectiva”*. Es decir que los Alimentos Enriquecidos poseen una incorporación de nutrientes considerados necesarios por la Autoridad Sanitaria a fin de contribuir en la mejora de las carencias de nutrientes que existen en la población.

Por otro lado, el Código Alimentario Argentino en su capítulo XVII, artículo 1.363, define a los Alimentos Fortificados como *“aquellos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente”*. Para el caso de los minerales, una porción del alimento fortificado deberá aportar entre un 20 a 50 % de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR). Muchos productos alimenticios y bebidas de consumo regular como jugos de frutas, productos lácteos, alimentos para lactantes y deportistas son fortificados con calcio en la actualidad.

Se ha estudiado mucho la fortificación de los alimentos con calcio a través de sales solubles en agua como el cloruro de calcio, carbonato de calcio, citrato de calcio, lactato de calcio y acetato de calcio (Soto y col., 2014). Estas sales presentan *menor*

solubilidad a pH neutro o básico, que es el pH del intestino en donde se produce casi la totalidad de la absorción del mineral (Eckert y col., 2014). Por lo tanto, una menor solubilidad implica una menor biodisponibilidad. Cuando se fortifican bebidas, la solubilidad, características de disolución y estabilidad de las sales son temas de extrema importancia en su diseño (Gerhard, 2002). Algunas de las características más importantes de las sales de calcio más frecuentemente utilizadas se muestran en la **Tabla 1**.

2. Caseinomacropéptido

Durante el proceso de elaboración del queso, se agregan enzimas coagulantes a la leche, como quimosina o pepsina, que provocan la hidrólisis enzimática de la κ -caseína en un enlace específico (Phe₁₀₅ - Met₁₀₆) dando lugar a dos fragmentos (**Figura 4**): a la para- κ -caseína que forma parte del coágulo (residuos 1-105) y a un péptido que permanece soluble en el suero, denominado caseinomacropéptido (CMP, residuos 106-169) también llamado glicomacropéptido (GMP) debido a su alto contenido de carbohidratos unidos a la cadena peptídica (Delfour y col., 1965). Aproximadamente el 50-60% del CMP está glicosilado (Thomä y col., 2006). El perfil de aminoácidos de este último y su contenido en azúcares lo hacen fuertemente polar y soluble en agua.

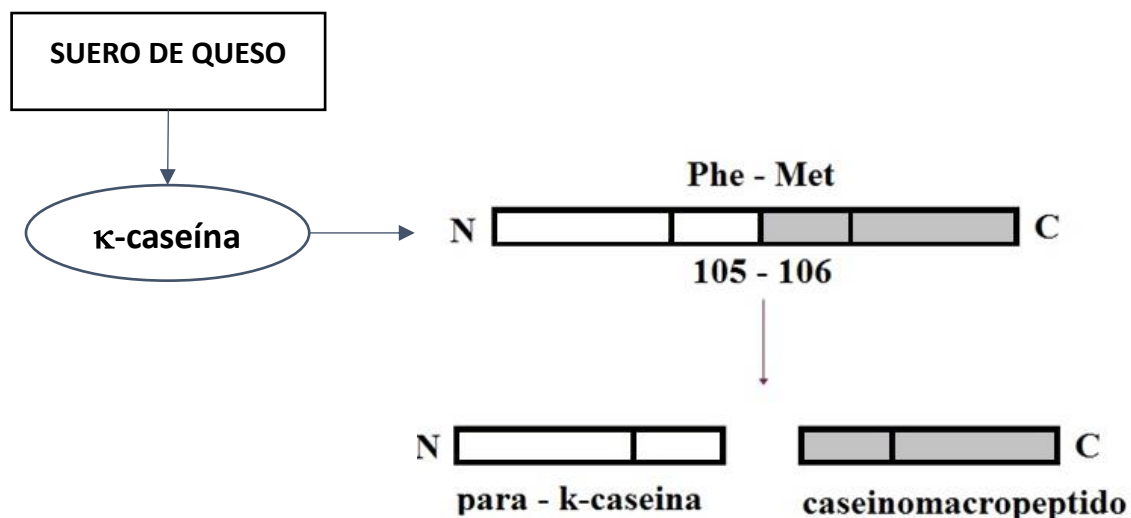


Figura 4. Esquema de la hidrólisis enzimática de la κ -caseína y la obtención del caseinomacropéptido.

En su secuencia de aminoácidos, el caseinomacropéptido contiene sólo un residuo de metionina y no contiene residuos de cisteína, por lo cual, no presenta uniones puente disulfuro. Tampoco tiene aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano, tirosina) en su composición y por lo tanto no da señal a 280 nm, la longitud de onda común para la detección de proteínas (Brody, 2000), pero puede ser detectado a 205-220 nm (El-Salam y col., 1996). Esta característica lo hace especialmente útil para el tratamiento de la fenilcetonuria (Marshall, 1991; Lim y col., 2007; Ney y col., 2008; Laclair y col., 2009), trastorno metabólico hereditario donde el cuerpo no metaboliza adecuadamente al aminoácido fenilalanina, por la deficiencia o ausencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa. El CMP es rico en aminoácidos de cadena ramificada (valina e isoleucina) y es pobre en otros aminoácidos esenciales (arginina, cisteína, histidina). Tiene muy alto contenido de treonina (11 residuos), razón por la cual puede causar hipertreoninemia en lactantes (Rigo y col., 2001).

En cuanto a su peso molecular, las formas A y B del CMP no glicosilado tienen una masa molecular teórica de 6787 y 6755 Da, respectivamente y el CMP altamente glicosilado de la variante A tiene una masa molecular de 9631 Da (Minkiewicz y col., 1996). La masa molecular promedio es aproximadamente 7500 Da (Mollé y col., 2005).

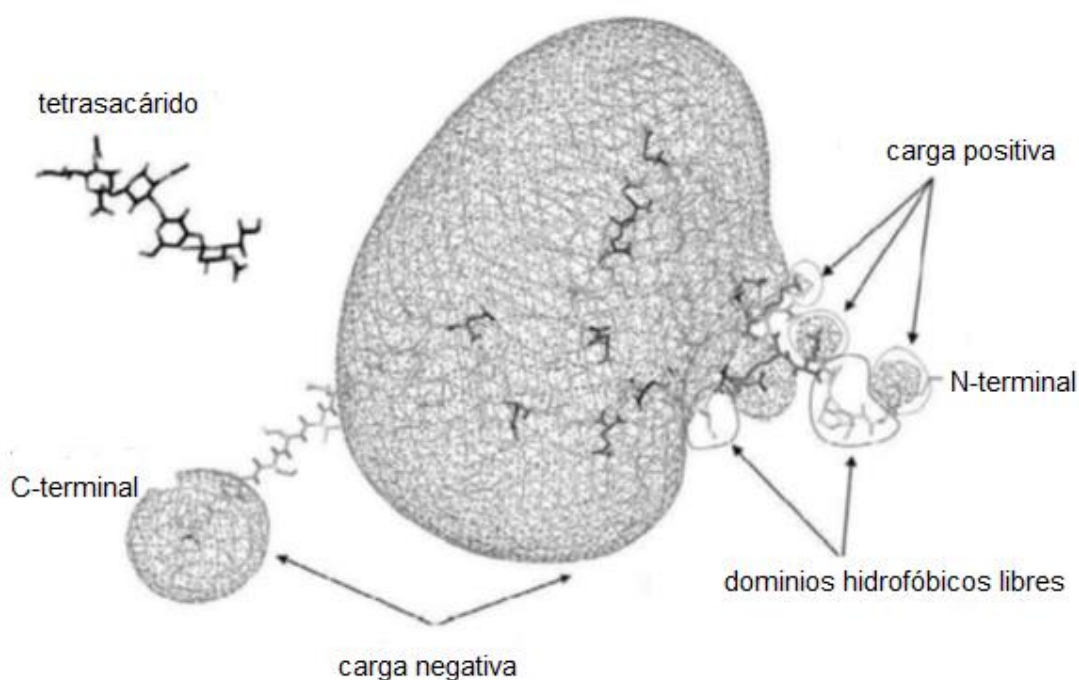


Figura 6. Estructura tridimensional del aCMP variante genética A y el gCMP (si se une al tetrasacárido) a pH 7 y fuerza iónica nula. Se indican las zonas C y N-terminal y los dominios hidrofóbicos libres (Kreuz y col., 2009b).

Kreuz y col. (2009b) sugirieron un modelo teórico de estructura tridimensional de CMP a través del modelado de proteínas y han demostrado que una gran parte del péptido presenta una fuerte carga negativa, y tres pequeños dominios con carga positiva en el extremo N-terminal a pH 7 y fuerza iónica nula (**Figura 6**). Además, se ha reportado que el CMP es un péptido intrínsecamente desordenado (IDP, de sus siglas en inglés) sin una estructura secundaria o terciaria definida (Ono y col., 1987) y que su conformación se modifica con cambios en la fuerza iónica, el pH y la presencia de otras moléculas.

2.2. Glicosilación y Fosforilación

En cuanto a los carbohidratos unidos a la cadena peptídica del CMP se han identificado una mezcla heterogénea de ellos, característica única que no se encuentra en el fragmento restante de κ -caseína (1 a 105). Los carbohidratos están unidos en las posiciones Thr 26, 28, 30, 37 y Ser 36 a través de enlaces de O-glicosilación (Eigel, 1984). Estas posiciones están ubicadas en el centro del esqueleto peptídico. La cadena peptídica puede contener diferentes oligosacáridos, que incluyen al ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico (NeuNAc); galactosa (Gal), y N-acetilgalactosamina (GalNAc), unidos covalentemente a los residuos de serina o treonina del CMP (Fernando y Woonton, 2010). Se considera al CMP como fuente de ácido siálico en el suero de queso (Nakano y col., 1999). El CMP comercialmente disponible con 78–83,7% de contenido de proteína contiene 7–9% de ácido siálico (Arla Food Ingredients y Davisco Foods International, Inc.) (Neelima y col., 2013).

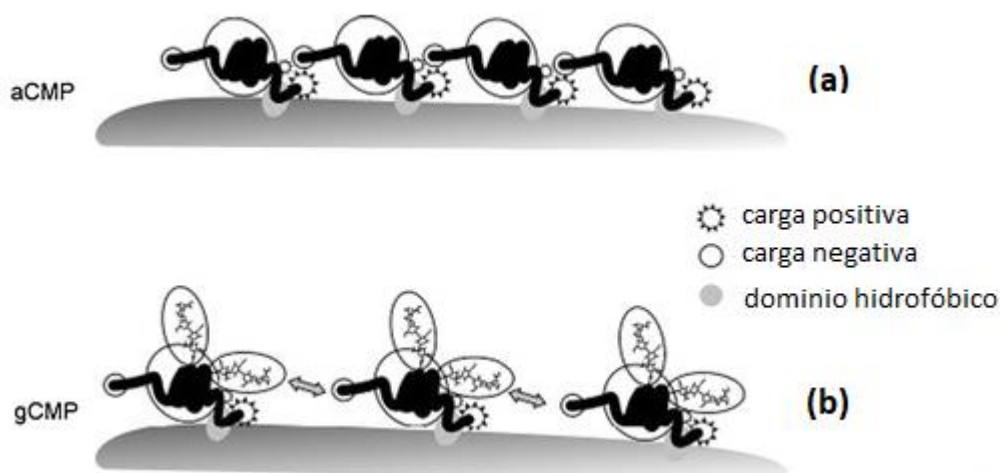


Figura 7. Esquema de las interacciones de las moléculas de (a) aglicosilado (aCMP) y (b) glicosilado (gCMP) (Kreuz y col., 2009b)

En base a su glicosilación, el CMP puede clasificarse en dos fracciones principales: el **gCMP** se denomina a las fracciones de caseinomacropéptido glicosiladas (y fosforiladas) y **aCMP** a las fracciones de caseinomacropéptido sin glicosilar ni fosforilar (**Figura 7**) (Kreuz y col., 2009b). La distribución de las cadenas de monosacárido (0,8%), disacárido (6,3%), trisacárido (18,4%) y tetrasacárido (56%) fue determinada por HPLC por Saito y Itoh (1992). Generalmente, el ácido siálico altamente cargado es el carbohidrato terminal (Kreuz y col., 2009b). Con respecto al grado de fosforilación, el principal sitio es la Ser₄₄ (Dziuba y Minkiewicz, 1996; Brody, 2000) que según Talbo y col. (2001) está siempre fosforilado. El segundo sitio de fosforilación más importante es la Ser₂₂ (Yuleivys y col., 2002).

Debido a la heterogeneidad en el grado de glicosilación y fosforilación, el CMP no tiene un único punto isoeléctrico (pI) (Cherkaoui y col., 1997; Silva-Hernández y col., 2002; Lieske y col., 2004; Kreuz y col., 2008). Mediante cromatografía de intercambio aniónico, Nakano y Ozimek (2000) reportaron que todas las formas gCMP presentaban un pI < 3,8. El pI de los 64 aminoácidos es alrededor de 4, pero el sialato y el fosfato tienen valores de pKa relativamente bajos de 2,6 y 2,0, respectivamente. Los valores de pI del CMP dependen entonces del contenido de ácido siálico y fosfato presente en él. Kreuz y col. (2009b), mediante electroforesis láser Doppler y medición del potencial zeta, encontraron que el pI de gCMP y aCMP era 3,15 y 4,15, respectivamente. El menor valor del pI de la forma glicosilada se debe a la presencia de un alto contenido de ácido siálico, con un pK de 2,2, lo que disminuiría el pI del péptido (Nakano y col., 2000; Silva-Hernández y col., 2002; Kreuz y col., 2009b).

El CMP contiene 2 residuos de Asp, 7 u 8 Glu (dependiendo de la variable genética), una Ser fosforilada y tres residuos de Lys. Por debajo de su pI, las moléculas de CMP pierden la carga negativa de los residuos de Glu y Asp, de los grupos carboxilos del C terminal y de los residuos de ácido siálico. La carga positiva que presenta el CMP por debajo de su pI se debe al residuo de Lys y al extremo N terminal cargados positivamente, y a que todos los residuos de Glu y Asp están protonados (Kreuz y col., 2009b; Farías y col., 2010).

2.3. Autoensamblaje

El caseinomacropéptido tiene la capacidad de asociarse y disociarse bajo condiciones de pH específicas (Farías y col., 2010) y las interacciones que pueden tener lugar son las electrostáticas, hidrofóbicas y puente hidrógeno.

El CMP es afectado por el pH ya que contiene dos residuos de Asp, siete u ocho de Glu (dependiendo de la variante B o A del CMP, respectivamente), una Ser fosforilada y tres residuos de Lys. El potencial zeta (ξ) representa el nivel de repulsión entre las moléculas que se encuentran en un entorno específico. A pH 7,0 y en ausencia de sales, el CMP tiene una fuerte carga negativa siendo su ξ de -24,12 mV (Martinez y col., 2013) (**Figura 8**). Al bajar el pH, las moléculas de CMP pierden la carga negativa de los residuos de Glu y Asp, así como los de los grupos carboxilos en el C-terminal y en los residuos de ácido siálico en gCMP.

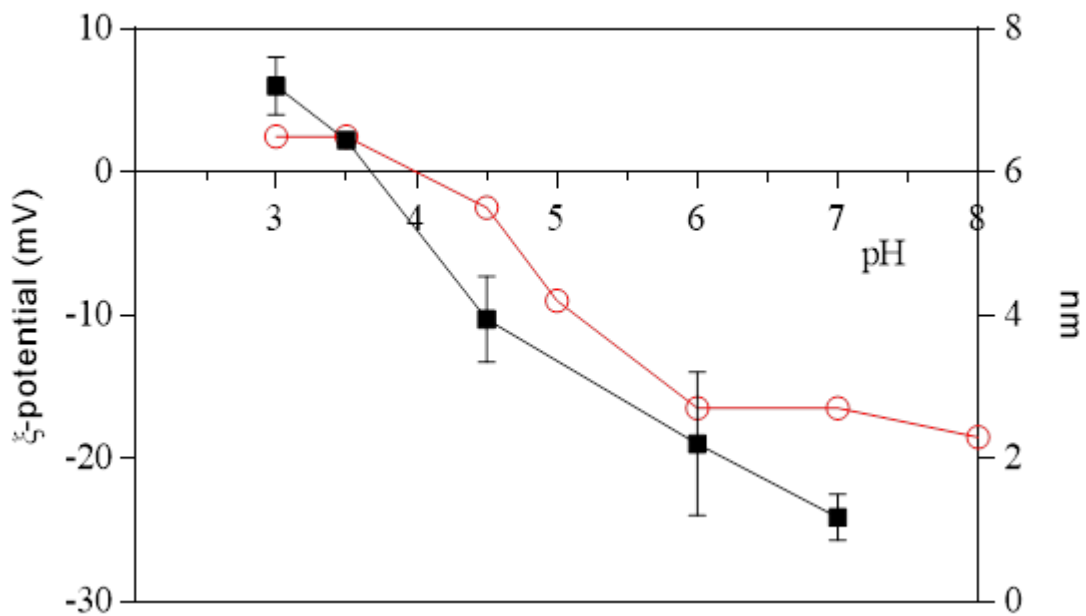


Figura 8. Efecto del pH sobre el potencial ξ (■) del CMP y sobre su $d(H)$ (○). Los datos del potencial ξ fueron obtenidos de von Staszewski y col. (2012) y Morales y col. (2016).

La **Figura 8** también muestra el efecto del pH sobre el diámetro hidrodinámico $d(H)$ de las moléculas de CMP. A pH 7,0, el CMP se encuentra como monómero (2,3 nm) y se autoensambla espontáneamente a pH < 4,5 ya sea a temperatura ambiente o por calentamiento, generando en el tiempo una estructura ordenada gelificada de características viscoelásticas, de baja dureza y cohesividad (Farias, 2012). Dicha estructura es reversible a un cambio posterior de pH, pero ya no vuelve a su forma monomérica. Farías y col. (2010) determinaron el tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz y se comprobó que a pH < 6 se forman dímeros, trímeros y tetrameros y a pH < 4,5 se encuentra inicialmente en forma polimérica, pero luego se observa un autoensamblaje espontáneo con el tiempo que finalmente puede conducir a la formación de geles.

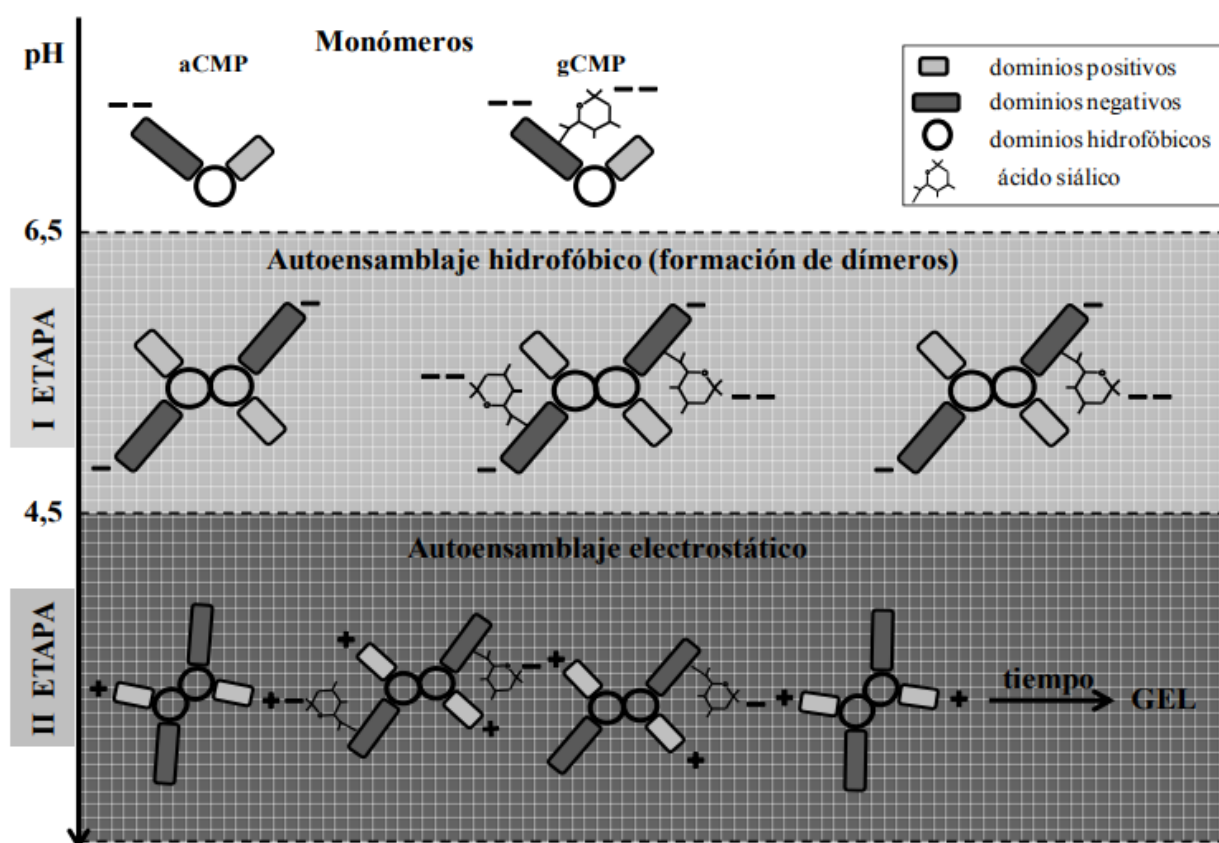


Figura 9. Esquema del modelo propuesto para explicar el autoensamblaje de CMP dependiente del pH y la formación de geles a temperatura ambiente (Farias, 2012).

Farías y col. (2010) describieron por primera vez el fenómeno de autoensamblaje del CMP a pH menor a 4,5, que lleva a una gelificación espontánea a temperatura ambiente con el tiempo. Se postuló un modelo en dos etapas (**Figura 9**) para explicar dicho proceso. La primera etapa ocurre al disminuir el pH a un valor por debajo de 6,5. Hay una fuerte disminución del valor absoluto del potencial zeta hasta el pI debido a un aumento en la protonación de las cadenas de aminoácidos acídicos (Kreuz y col., 2009b). Por lo tanto, el apantallamiento por las cargas negativas comienza a disminuir permitiendo que el dominio hidrofóbico terminal (AA 1–5), que no está apantallado por carga negativa, interactúe primero, seguido por dominios hidrofóbicos ubicados en el centro de la cadena peptídica. De esta manera se forman dímeros por autoensamblaje hidrofóbico a temperatura ambiente.

La segunda etapa del autoensamblaje ocurre al disminuir el pH a un valor menor a 4,5. Las interacciones electrostáticas entre dímeros de aCMP con carga positiva neta y dímeros negativamente cargados de gCMP, como también de dímeros mixtos aCMP-gCMP da lugar al autoensamblaje electroestático. A pH 4, el aCMP alcanza su pI, mientras que el gCMP se encuentra en su estado isoeléctrico a pH 3,15 (Kreuz y col., 2009b). Sin embargo, debido al bajo pKa (2,2) de los residuos de ácido siálico, a pH cercanos a 2,0 podrían permanecer aún cargas negativas locales, permitiendo la interacción con cargas positivas. Así en el rango de pH entre 2 y 4,5, el autoensamblaje podría proceder mediante fuerzas electrostáticas para formar geles con el tiempo a temperatura ambiente.

Martinez y col. (2011) comprobaron que la temperatura acelera la gelificación del CMP debido a un aumento en la velocidad de la Etapa I del autoensamblaje (**Figura 9**) mediado por interacciones hidrofóbicas las cuales se ven favorecidas a altas temperaturas.

2.4. Propiedades Bioactivas

El caseinomacropéptido presenta valiosas propiedades bioactivas que lo hacen un ingrediente particularmente útil para aumentar la calidad de diversos productos alimenticios (Tolkach y Kulozik, 2005). Originalmente, el estudio del CMP se enfocó en su detección, en especial para reconocer la falsificación de leche por el agregado de suero de queso (Thomä y col., 2006) o como seguimiento del proceso enzimático de la coagulación del queso (Coolbear y col., 1996). En la actualidad, las investigaciones se centran principalmente en sus propiedades bioactivas y en menor medida en sus propiedades funcionales (Kreuz y col., 2009a).

Las propiedades bioactivas del CMP han sido muy estudiadas (Kawasaki y col., 1993; Dziuba y col., 1996; El-Salam y col., 1996; Brody, 2000; Thomä-Worringer y col., 2006), entre ellas se encuentran:

- **Actividad antimicrobiana:**

- Inhibición de infecciones bacterianas y virales
- Neutralización de endotoxinas
- Inhibición de las toxinas del cólera por unión a los sitios receptores en la membrana del patógeno (Isoda y col., 1992; Kawasaki y col., 1993).
- Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* (Isoda y col., 1992; Nakajima y col., 2005), *Salmonella typhimurium* (Otani y Monnai, 1993), *Salmonella enteritis* (Nakajima y col., 2005) y *Shigella flexneri* (Brück y col., 2002; Brück y col., 2006).
- Inhibición de la adhesión de las bacterias *Streptococcus mutans* (Janer y col., 2004a), *S. Vangis* y *S. Sobrinus* en la cavidad oral (causante de caries) y del virus de la influenza (Dosako y col., 1992).

- **Actividad moduladora:**

- Modulación de las hormonas de saciedad, especialmente colecistocinina (CCK) en ratas (Burton-Freeman, 2008; Requena y col., 2009). En humanos, su efecto en la saciedad no está aún demostrado (Gustafson y col., 2001; Keogh y Clifton, 2008; Chung Chun Lam y col., 2009; Veldhorst y col., 2009). Sin embargo, Xu y col. (2011) mostraron que el CMP puede inhibir la proliferación, diferenciación y acumulación de lípidos en preadipositos *in vitro*.

- Modulación de la composición de la placa dental bacteriana, la reducción de la disolución de hidroxiapatita (componente estructural de los dientes) (Nejad y col., 2009) y la promoción de la remineralización (Aimutis, 2004).
- Modulación de la microflora, ya que el CMP es promotor del crecimiento de probióticos (Janer y col., 2004b) y bifidobacterias (*Bifidobacterium breve*, *B. Bifidum*, *B. Infantis* tanto como *Lactococcus lactis*) debido a su contenido de grupos glicosilados (Idota et al., 1994; Manso y López Fandiño, 2004), y tiene un efecto antiinflamatorio indirecto en el intestino (Brück y col., 2003; Daddaoua y col., 2005; Brück y col., 2006; Requena y col., 2009; Requena y col., 2010).
- **Actividad antitrombótica:**
 - El CMP está considerado como antitrombótico como también algunos péptidos resultado de su digestión (Chabance y col., 1995; Rutherford y Gill, 2000). Se ha comprobado *in vitro* que los péptidos derivados del extremo carboxilo terminal de la κ -caseína bovina y fundamentalmente el fragmento f(106-116) son inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano al receptor específico de la membrana de las plaquetas (Jollés, 1986).
- **Efecto antihipertensivo:**
 - Estudios en animales revelaron un efecto antihipertensivo del CMP hidrolizado (Miguel y col., 2007).

Todas las actividades bioactivas mencionadas explican el interés de incorporar el CMP en los alimentos. Además, está considerado como GRAS (sustancias generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas del inglés “generally recognized as safe” por el Departamento de Administración de Alimentos de Estados Unidos (USFDA). Algunos estudios han considerado que no sólo el péptido sino también los grupos glicosilados son responsables de las propiedades biológicas y funcionales del CMP (Li y Mine, 2004; Manso y Lopez-Fandiño, 2004). El ácido siálico es particularmente importante en la actividad biológica del CMP y en algunos casos su pérdida reduce la bioactividad (Daali y col., 2001). La **Tabla 2** muestra un resumen de los estudios realizados sobre las propiedades biológicas del CMP y el rol de la cadena principal del péptido y sus residuos de carbohidratos.

Tabla 2. Rol de la cadena principal y de los residuos de carbohidratos en diversas propiedades biológicas del CMP. Adaptada de Neelima y col. (2013).

Propiedades biológicas	Rol de los residuos de carbohidratos	Rol de la cadena principal del péptido	Referencias
Reducción de la secreción gástrica		✓	Aleinik y col. (1984)
Promotor del crecimiento de Bifidobacterias		✓	Azuma y col. (1984)
Efecto anticancerígeno		✓	(Neeser y col., 1988; Neeser y col., 1994); Aimutis (2004)
Inhibición de la toxina del cólera	✓		Isoda y col. (1992)
Modulación de la respuesta inmune	✓	✓	(Otani y col., 1992; Requena y col., 2010)
Actividad antitrombótica	✓		Kawasaki y col. (1993)
Estimulación de la liberación de colecistoquinina	✓	✓	(Beucher y col., 1994; Burton-Freeman, 2008)
Prevención de infección intestinal	✓		Nakajima y col. (2005)
Manejo nutricional de la fenilcetonuria		✓	(Laclair y col., 2009; van Calcar y Ney, 2012)
Actividad antibacteriana y probacteriana del CMP tratado con pepsina		✓	Robitaille y col. (2012)

2.5. Propiedades Funcionales

Las propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas con sus propiedades físicas, químicas y conformacionales, como su tamaño, forma, composición y secuencia aminoacídica, carga y distribución de carga (Boye y col., 1997). Al igual que las propiedades biológicas, las propiedades funcionales se ven igualmente afectadas por la glicosilación del CMP. Entre sus propiedades funcionales más importantes se encuentran la gelificación y las propiedades interfaciales, espumantes y emulsionantes.

El CMP se encuentra disponible comercialmente como un polvo blanco, similar a la leche en polvo, ideal para utilizarse como suplemento dietario (Ahmed y Ramaswamy, 2003). Es altamente hidrofílico, muy soluble en agua aún a bajos valores de pH y no es afectado por tratamientos térmicos.

Con respecto a las propiedades interfaciales, el CMP ha demostrado ser un péptido con una buena actividad superficial (Martinez y col., 2009b; Martinez y col., 2013). Ha sido descrito y caracterizado su comportamiento en interfases aire/agua (A/W) a diferentes concentraciones de CMP (0,01-4 % p/p) y diferentes condiciones de pH (5 y 7) (Martinez y col., 2009a). En cuanto a su capacidad emulsionante, el CMP, tiene una actividad máxima a pH alcalino y mínima en el rango de pH 4,5 – 5,5, sin embargo, su estabilidad se deteriora después de 24 h de almacenamiento, principalmente a pH neutro y alcalino (Kreuz y col., 2009b; Morales y col., 2019). Thöma-Worringer y col. (2007) hallaron un efecto sinérgico entre el CMP y las proteínas del suero sobre las propiedades espumantes ya que mientras el CMP es más eficiente para reducir la tensión superficial y asegurar un alto contenido de gas durante la formación de la espuma, las proteínas del suero son capaces de reducir la permeabilidad del gas y de inhibir la coalescencia de las burbujas debido a la generación de películas estables en la interfase. Por otro lado, Morales y col. (2017) demostraron el efecto sinérgico del CMP sobre las propiedades espumantes del caseinato de sodio.

La gelificación puede ser definida como un fenómeno de agregación ordenada en el cual fuerzas atractivas y repulsivas están balanceadas de modo de obtener una matriz o red proteica capaz de retener una gran cantidad de agua (Hermansson, 1988). Tal como se mencionó anteriormente, el CMP tiene la capacidad de autoensamblarse espontáneamente a $\text{pH} < 4,5$ a temperatura ambiente o por calentamiento, generando una estructura ordenada gelificada. Dicha estructura es reversible a un cambio ulterior de pH pero no a la forma monomérica (Farias, 2012). Ahmed y Ramaswamy (2003) concluyeron que una solución de CMP al 12,5% (p/p) gelifica a 80°C y pH 7. Más recientemente se estudiaron las propiedades de gelificación del CMP en diferentes condiciones de pH (Farías y col., 2010), temperatura (Martinez y col., 2011), concentración (Farías y Pilosof, 2009), presencia de β -lactoglobulina (Martinez y col., 2010) y polifenoles de té verde (von Staszewski y col., 2012). Farias (2012) propuso un mecanismo de gelificación del CMP en presencia de HCl tanto a temperatura ambiente como por calentamiento y se muestra en la **Figura 10**:

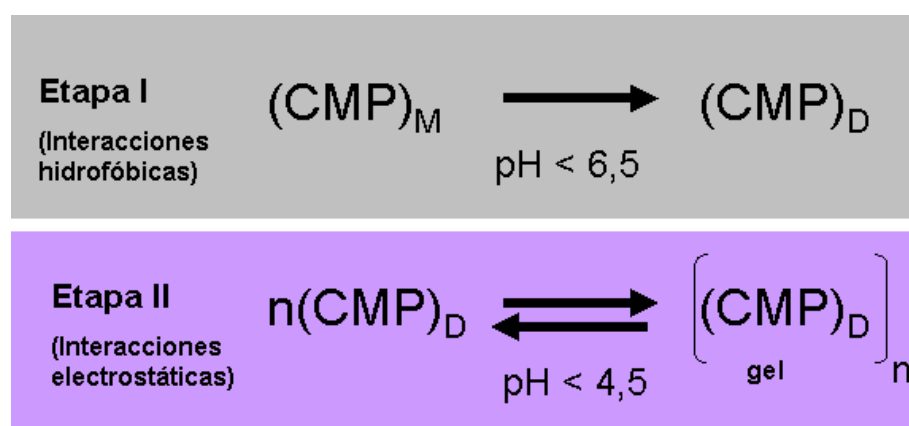


Figura 10. Mecanismo general de la gelificación del CMP en presencia de HCl. Símbolos: $(\text{CMP})_M$: monómeros de CMP, $(\text{CMP})_D$: dímeros de CMP, $[(\text{CMP})_D]_n$: polímeros de CMP (gel) (Farias, 2012).

La gelificación del CMP ocurre como consecuencia de su autoensamblaje que involucra dos etapas. La primera etapa mediada por interacciones hidrofóbicas en la que se forman dímeros, los cuales son estables a posteriores cambios de pH . En una segunda etapa, los dímeros se unen a través de interacciones electrostáticas y forman geles con el tiempo. El incremento de la temperatura favorecería el primer paso del autoensamblaje que involucraría interacciones hidrofóbicas, aumentando la velocidad de gelificación.

2.6. Motivación para utilizar el CMP como potencial ligante de calcio

Se han realizado numerosos estudios para la utilización de péptidos de cadena corta como ligantes de calcio como medio de suplementación de este mineral (Ferraretto y col., 2001; Phelan y col., 2009; Charoenphun y col., 2013; Eckert y col., 2014), pero el principal inconveniente es la baja proporción obtenida y la dificultad en la separación. A diferencia de estos péptidos, el CMP constituye entre el 15 y 20 % de las proteínas en el suero de queso (El-Salam y col., 1996; Wang y Lucey, 2003; Thomä-Worringer y col., 2006) y se encuentra en abundancia por ser un subproducto de la industria láctea.

Según datos del INTA (Taberna, 2014), cada año en Argentina el 34% de la producción de leche se destina a la elaboración de queso y como resultado de dicha actividad se generan 450 mil toneladas anuales de suero líquido. El destino del suero obtenido se puede dividir en 5% para la producción de suero en polvo, el 33% a elaboración de derivados proteicos y a la obtención de lactosa, y el resto (aproximadamente unas 270 mil toneladas) se destina para alimentación animal o se desecha. Actualmente, existe una necesidad de conversión del suero de queso en productos de valor agregado debido fundamentalmente a la disminución de su impacto ambiental, al aprovechamiento de los nutrientes que el suero posee, a la necesidad de satisfacer la demanda de sus subproductos y aportar al desarrollo regional y nacional. Lo más interesante que se plantea hoy es que cada uno de los péptidos y proteínas del suero es más valioso por separado que como suero seco.

La motivación para usar al CMP como péptido ligante de calcio está basada en varios motivos: la importante cantidad de aminoácidos glutamato y aspartato (Meisel y Olieman, 1998), una secuencia de aminoácidos que sería sinérgica (Vavrusova y col., 2014), la presencia de un grupo fosforilado en Ser (44) (Brody, 2000), un alto grado de glicosilación donde predomina el ácido siálico (pKa 2,1) que permitiría la interacción con el calcio iónico aún en condiciones muy ácidas, su elevada carga negativa a pH superior a 4,5, sus importantes propiedades biológicas (Brody, 2000) y su abundancia por ser un subproducto de la quesería. Además, la propiedad del CMP de autoensamblarse aún a temperatura ambiente para formar geles reversibles por pH, junto con sus propiedades bioactivas y nutricionales hacen de este péptido un ingrediente de enorme potencialidad para el desarrollo de nuevos productos.

El CMP podría incrementar la bioaccesibilidad de los fortificantes de calcio de uso frecuente (cloruro de calcio; lactato de calcio; citrato de calcio; acetato de calcio y carbonato de calcio) cuando estas sales se ingieran junto al CMP por vía oral y revalorizar al suero de queso que en la actualidad su descarte es un problema para la industria alimenticia debido a su elevada carga orgánica.

3. Referencias

- Ahmed, J.y Ramaswamy, H. S. (2003). "Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide." *Journal of Dairy Science* **86**: 1535-1540.
- Aimutis, W. R. (2004). "Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis." *J Nutr* **134**(4): 989s-995s.
- Aleinik, S. I., Stan, E.y Chernikov, M. P. (1984). "[Glycopeptide obtained from k-casein and its effect on protein assimilation]." *Vopr Pitan*(2): 47-50.
- Anmat. (2012). from http://www.anmat.gov.ar/Publicaciones/alimentos_funcionales.asp.
- Azuma, N., Yamauchi, K.y Mitsuoka, T. (1984). "Bifidus Growth-promoting Activity of a Glycomacropeptide Derived from Human K-Casein." *Agricultural and Biological Chemistry* **48**(8): 2159-2162.
- Beers, M. B., Robert (1999). *El Manual Merck*: 152-153.
- Beucher, S., Levenez, F., Yvon, M.y Corring, T. (1994). "Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat." *The Journal of Nutritional Biochemistry* **5**(12): 578-584.
- Boye, J., Mar, C. Y.y Harwalkar, V. R. (1997). "Thermal denaturation and coagulation of proteins." *Food Sci. Technol.* **80**: 25-26.
- Brody, E. P. (2000). "Biological activities of bovine glycomacropeptide." *British Journal of Nutrition* **84**: 39-46.
- Brück, W. M., Graverholt, G.y Gibson, G. R. (2002). "Use of batch culture and a two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria." *FEMS Microbiology Ecology* **41**(3): 231-237.
- Brück, W. M., Kelleher, S. L., Gibson, G. R., Graverholt, G.y Lönnerdal, B. L. (2006). "The effects of α -lactalbumin and glycomacropeptide on the association of CaCo-2 cells by enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*." *FEMS Microbiol Lett* **259**: 158-162.
- Brück, W. M., Kelleher, S. L., Gibson, G. R., Nielsen, K. E., Chatterton, D. E. W.y Lönnerdal, B. (2003). "rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **37**: 273-280.
- Buckley, G. (1989). "MARTINDALE: THE EXTRA PHARMACOPOEIA (29th edition)." *The Journal of the Royal College of General Practitioners* **39**(327): 440-440.
- Burton-Freeman, B. M. (2008). "Glycomacropeptide (GMP) is not critical to whey-induced satiety, but may have a unique role in energy intake regulation through cholecystikinin (CCK)." *Physiology & Behavior* **93**(1-2): 379-387.
- Coolbear, K. P., Elgar, D. F.y Ayers, J. S. (1996). "Profiling of genetic variants of bovine k-casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques." *International Dairy Journal* **6**(11-12): 1055-1068.
- Chabance, B., Jolles, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoal, C.y Drouet, L. (1995). "Characterization of an antithrombotic peptide from k-casein in newborn plasma after milk ingestion." *British Journal of Nutrition* **73**: 583-590.
- Charoenphun, N., Cheirsilp, B., Sirinupong, N.y Youravong, W. (2013). "Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate." *Eur Food Res Technol* **236**: 57-63.
- Chen, D., Mu, X., Huang, H., Nie, R., Liu, Z.y Zeng, M. (2014). "Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats." *Journal of Functional Foods* **6**: 575-584.
- Chen, M., Ji, H., Zhang, Z., Zeng, X., Su, W.y Liu, S. (2019). "A novel calcium-chelating peptide purified from *Auxis thazard* protein hydrolysate and its binding properties with calcium." *Journal of Functional Foods* **60**: 103447.

- Cherkaoui, S., Doumenc, N., Tachon, P., Neeser, J.-R. y Veuthey, J.-L. (1997). "Development of a capillary zone electrophoresis method for caseinoglycomacropeptide determination." *Journal of Chromatography A* **790**(1-2): 195-205.
- Chung Chun Lam, S. M. S., Moughan, P. J., Awati, A. y Morton, H. R. (2009). "The influence of whey protein and glycomacropeptide on satiety in adult humans." *Physiology & Behavior* **96**(1): 162-168.
- Daali, Y., Cherkaoui, S. y Veuthey, J.-L. (2001). "Capillary electrophoresis and high-performance anion exchange chromatography for monitoring caseinoglycomacropeptide sialylation." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24**(5-6): 849-856.
- Daddaoua, A., Puerta, V., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Medina, F. S. d. y Martínez-Augustín, O. (2005). "Bovine Glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis." *Journal of Nutrition* **135**: 1164-1170.
- Delfour, A., Jolles, J., Alais, C. y Jolles, P. (1965). "Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**: 452-455.
- Dosako, S., Kusano, H., Deya, E. y Idota, T. (1992). Infection protectant. United States Patent 5147853.
- Douthat, W., Cardozo, G., Dauverne, L., Nores, L., Orozco, S., Garay, G., y col. (2009). "Rol de la dieta sobre los trastornos del metabolismo óseo y mineral en pacientes con IRC en diálisis." *Experiencia médica* **2**: 76-82.
- Dziuba, J. y Minkiewicz, P. (1996). "Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein." *International Dairy Journal* **6**(11-12): 1017-1044.
- Eckert, E., Bamdad, F. y Chen, L. (2014). "Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein." *Food Chemistry* **159**(0): 498-506.
- Eigel, W., Butler, J., Ernstrom, C., Farrel, H., Harwalker, V., Jenness, R. & Whitney, R. (1984). "Nomenclature of proteins of cow's milk." *Journal of Dairy Science* **Fift revision**(67): 1599-1631.
- El-Salam, M. H. A., El-Shibiny, S. y Buchheim, W. (1996). "Characteristics and potential uses of the casein macropeptide." *International Dairy Journal* **6**(4): 327-341.
- Fao (2001). "Human Vitamin and Mineral Requirements, Report 07a." Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Thailand, .
- Fao (2002). Procesamiento y fortificación de los alimentos. Nutrición humana en el mundo en desarrollo C. F. A. y. n. N. 29.
- Farias, M. E. (2012). Autoensamblaje del caseinomacropéptido (CMP) y su impacto en la gelificación y espumado. Tesis de doctorado, Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Farías, M. E., Martínez, M. J. y Pilosof, A. M. R. (2010). "Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation." *International Dairy Journal*. **20**: 79-88.
- Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2009). "Influencia del pH y la concentración en la gelificación del caseinoglicomacropéptido." *Trabajos completos del III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Tomo IV. Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Análisis Físicos, Químicos y Sensoriales*: 133- 139.
- Fernández, S. P., Setton D, et al. (2011). Calcio y nutrición Sociedad Argentina de Pediatría.
- Fernando, S. F. y Woonton, B. W. (2010). "Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP)." *Journal of Food Composition and Analysis* **23**(4): 359-366.
- Ferraretto, A., Signorile, A., Gravaghi, C., Fiorilli, A. y Tettamanti, G. (2001). "Casein Phosphopeptides Influence Calcium Uptake by Cultured Human Intestinal HT-29 Tumor Cells." *J Nutr* **131** (6): 1655-1661.
- Gennaro, A. R. (1998). Remington: Farmacia, Editorial Médica PANamericana.
- Gerhard, G. (2002). "El desafío de la fortificación." *Énfasis Alimentación* **4**: 62-65.

- Gueguen, L. P., A. (2000). "The bioavailability of dietary calcium." *Journal of the American College of Nutrition* **19**: 119S-136S.
- Gustafson, D. R., McMahon, D. J., Morrey, J. y Nan, R. (2001). "Appetite is not influenced by a unique milk peptide: caseinomacropeptide (CMP)." *Appetite* **36**(2): 157-163.
- Hallberg, L. H., L (2000). "Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron." *The American Journal of Clinical Nutrition* **71**(5): 1147-1160.
- Heaney, R. P. W., C.M.; Recker, R.R. (1998). "Calcium absorption from spinach." *The American Journal of Clinical Nutrition* **47**: 707-709.
- Hermansson, A. M. B., J.M. (1988). *Food Structure: Creation and Evaluation*. Food Structure Butterworths. London.
- Illanes, A. y Guerrero, C. (2016). Chapter 2 - Functional Foods and Feeds: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Lactose-Derived Prebiotics. San Diego, Academic Press: 35-86.
- Isoda, H., Kawasaki, Y., Tanimoto, M., Dosako, S. y Idota, T. (1992). Use of compounds containing or binding sialic acid to neutralize bacterial toxins. European Patent 385112.
- Janer, C., Díaz, J., Peláez, C. y Requena, T. (2004a). "The effect of caseinomacropeptide and whey protein concentrate on *Streptococcus mutans* adhesion to polystyrene surfaces and cell aggregation." *Journal of Food Quality* **27**(3): 233-238.
- Janer, C., Peláez, C. y Requena, T. (2004b). "Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk." *Food Chemistry* **86**: 263-267.
- Jollés, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A. y Caen, J.P. (1986). "Analogy between fibrinogen and casein." *European Journal of Biochemistry* **158**: 379-382.
- Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, A., Kotake, M., y col. (1993). "pH-Dependent molecular weight changes of k-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration." *Milchwissenschaft* **48**: 191-196.
- Keogh, J. B. y Clifton, P. (2008). "The effect of meal replacements high in glycomacropeptide on weight loss and markers of cardiovascular disease risk." *Am J Clin Nutr* **87**: 1602-1605.
- Kreuz, M., Krause, I. y Kulozik, U. (2008). "Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropeptide using different anion-exchange stationary phases." *Journal of Chromatography A* **1208**(1-2): 126-132.
- Kreuz, M., Krause, I. y Kulozik, U. (2009a). "Influence of glycosylation on foaming properties of bovine caseinomacropeptide." *International Dairy Journal* **19**(12): 715-720.
- Kreuz, M., Strixner, T. y Kulozik, U. (2009b). "The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide." *Food Hydrocolloids* **23**(7): 1818-1826.
- Laclair, C. E., Ney, D. M., Macleod, E. L. y Etzel, M. R. (2009). "Purification and use of glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria." *Journal of food science* **74**(4): E199-E206.
- Lee Gallagher, M. (2009). Los nutrientes y su metabolismo. Krause. Dietoterapia: 39-143.
- Li, E. W. Y. y Mine, Y. (2004). "Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophage cells, U937." *Journal of Agricultural Food Chemistry* **52**: 2704-2708.
- Lieske, B., Konrad, G. y Kleinschmidt, T. H. (2004). "Isolation of caseinomacropeptide from rennet whey by a multi-stage ultrafiltration process. II. Influence of pH and heating on the carbohydrate moiety of glycomacropeptide." *Milchwissenschaft* **59**: 291-294.
- Lim, K., Van Calcar, S. C., Nelson, K. L., Gleason, S. T. y Ney, D. M. (2007). "Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU." *Molecular Genetics and Metabolism* **92**(1-2): 176-178.
- López, L. B. S., Marta María (2005). *Fundamentos de nutrición normal*, El Ateneo.

- Manso, M. A.y Lopez-Fandiño, R. (2004). "k-Casein macropeptide from cheese whey: physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses." *Food Reviews International* **20**: 339-355.
- Marshall, S. (1991). "Casein macropeptide from whey -a new product opportunity." *Food Research Quaterly* **51**: 86-91.
- Martinez, M. J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M.y Pilosof, A. M. R. (2009a). "Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air-water interface of caseinoglycomacropeptide (GMP) and b-lactoglobulin mixed systems." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **68**(1): 39-47.
- Martinez, M. J., Farías, M. E.y Pilosof, A. M. R. (2010). "The dynamics of heat gelation of casein glycomacropeptide - b-lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase." *International Dairy Journal* **20**(9): 580-588.
- Martinez, M. J., Farías, M. E.y Pilosof, A. M. R. (2011). "Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating." *Food Hydrocolloids* **25**(5): 860-867.
- Martinez, M. J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M.y Pilosof, A. M. R. (2013). "Foaming and surface properties of casein glycomacropeptide–gelatin mixtures as affected by their interactions in the aqueous phase." *Food Hydrocolloids* **33**(1): 48-57.
- Martinez, M. J., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R.y Pilosof, A. M. R. (2009b). "Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP)." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **71**(2): 230-237.
- Meisel, H.y Olieman, C. (1998). "Estimation of calcium-binding constants of casein phosphopeptides by capillary zone electrophoresis." *Analytica Chimica Acta* **372**(1-2): 291-297.
- Mercier, J.-C., Uro, J., Ribadeau-Dumas, B.y Grosclaude, F. (1972). "Structure primaire du caseinomacropeptide de la caseine K B, bovine." *Eur. J. Biochem.* **27**: 535-547.
- Miguel, M., Manso, M. A., López-Fandiño, R., Alonso, M. J.y Salaices, M. (2007). "Vascular effects and antihypertensive properties of k-casein macropeptide." *International Dairy Journal* **17**(12): 1473-1477.
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H.y Elaissari, A. (2013). "Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications." *International Journal of Pharmaceutics* **445**(1): 181-195.
- Minkiewicz, P., Slangen, C. J., Lagerwerf, F. M., Haverkamp, J., Rollema, H. S.y Visser, S. (1996). "Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine κ -casein macropeptide and characterization of isolated fractions." *Journal of Chromatography A* **743**(1): 123-135.
- Mollé, D.y Léonil, J. (2005). "Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS)." *International Dairy Journal* **15**(5): 419-428.
- Morales, R., Martinez, M. J.y Pilosof, A. M. R. (2016). "Dynamics of gelation, textural and microstructural properties of gelatin gels in the presence of casein glycomacropeptide." *Food Research International* **84**: 102-107.
- Morales, R., Martinez, M. J.y Pilosof, A. M. R. (2017). "Synergistic effect of casein glycomacropeptide on sodium caseinate foaming properties." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **159**: 501-508.
- Morales, R., Martinez, M. J.y Pilosof, A. M. R. (2019). "pH-induced cold gelation of caseinoglycomacropeptide emulsions." *Food Hydrocolloids* **87**: 805-813.
- Mota-Blancas, E. P.-C., Eduardo (1999). "Los mecanismos de absorción de calcio y los modificadores de absorción con base para la elaboración de una dieta de bajo costo para pacientes osteoporóticas." *Gac Méd Méx* **135**(3): 291-304.
- Nakajima, K., Tamura, N., Kobayashi-Hattori, K., Yoshida, T., Hara-Kudo, Y., Ikedo, M., y col. (2005). "Prevention of intestinal infection by Glycomacropeptide." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 2294-2301.

- Nakano, T.y Ozimek, L. (1999). "Determination of sialic acid by the thiobarbituric acid reaction in sweet whey and its fractions." *J. Agric. Food Chem.* **47**: 2613-2616.
- Nakano, T.y Ozimek, L. (2000). "Purification of glycomacropeptide from dialyzed and non-dialyzable sweet whey by anion-exchange chromatography at different pH values." *Biotechnology Letters* **22**: 1081-1086.
- Neelima, Sharma, R., Rajput, Y. S.y Mann, B. (2013). "Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review." *Dairy science & technology* **93**(1): 21-43.
- Neeser, J. R., Chambaz, A., Del Vedovo, S., Prigent, M. J.y Guggenheim, B. (1988). "Specific and nonspecific inhibition of adhesion of oral actinomyces and streptococci to erythrocytes and polystyrene by caseinoglycopeptide derivatives." *Infection and immunity* **56**(12): 3201-3208.
- Neeser, J. R., Golliard, M., Woltz, A., Rouvet, M., Dillmann, M. L.y Guggenheim, B. (1994). "In vitro modulation of oral bacterial adhesion to saliva-coated hydroxyapatite beads by milk casein derivatives." *Oral Microbiol Immunol* **9**(4): 193-201.
- Nejad, A. S., Kanekanian, A.y Tatham, A. (2009). "The inhibitory effect of glycomacropeptide on dental erosion." *Dairy Sci. Technol.* **89**(3-4): 233-239.
- Ney, D. M., Hull, A. K., Van Calcar, S. C., Liu, X.y Etzel, M. R. (2008). "Dietary Glycomacropeptide supports growth and reduces the concentrations of phenylalanine in plasma and brain in a murine model of phenylketonuria." *J. Nutr.* **138**(2): 316-322.
- Ono, T., Yada, R., Yutani, K.y Nakai, S. (1987). "Comparison of conformations of k-casein, para-k-casein and glycomacropeptide." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **911**(3): 318-325.
- Otani, H.y Monnai, M. (1993). "Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by bovine Kappa-casein digests." *Food and Agricultural Immunology* **5**: 219-229.
- Otani, H. S. U., Nagano-ken (Japan). Faculty of Agriculture), Monnai, M.y Hosono, A. (1992). "Bovine k-casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation." **v. 47**.
- Peng, Z., Hou, H., Zhang, K.y Li, B. (2017). "Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats." *Food Chemistry* **221**: 373-378.
- Phelan, M., Aherne, A., Fitzgerald, R. J.y O'brien, N. M. (2009). "Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status." *International Dairy Journal* **19**: 643-654.
- Portela, M. L. P. M. d. (2015). Aspectos Nutricionales de Vitaminas y Minerales en el Siglo XXI, Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios (AATA).
- Quesada Gómez, J. S., Henríquez (2011). "Nutrición y osteoporosis. Calcio y vitamina D." *Rev Osteoporos Metab Miner* **3**(4): 165-182.
- Quintero Gutierrez, A. (2002). Desarrollo de un alimento funcional a partir de hierro hémico y evaluación de su biodisponibilidad para la prevención y corrección de la deficiencia de hierro. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Recker, R. R. (1985). "Calcium absorption and achlorhydria." *N Engl J Med* **313**(2): 70-73.
- Requena, P., Daddaoua, A., Guadix, E., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Medina, F. S. d., y col. (2009). "Bovine glycomacropeptide induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF- κ B signal transduction pathways." *British Journal of Pharmacology* **157**: 1232-1240.
- Requena, P., González, R., López-Posadas, R., Abadía-Molina, A., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., y col. (2010). "The intestinal antiinflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes." *Biochemical Pharmacology* **79**: 1797-1804.
- Riechman, R. C., Pascual (2005). Alimentación del niño y del adolescente. Alimentación y Nutrición - Manual teórico práctico. M. Díaz Santos: p. 199-214.

- Rigo, J., Boehm, G., Georgi, G., Jelinek, J., Nyambugabo, K., Sawatzki, G., y col. (2001). "An infant formula free of Glycomacropeptide prevents hyperthreoninemia in formula-fed preterm infants." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **32**: 127-130.
- Robitaille, G., Lapointe, C., Leclerc, D. y Britten, M. (2012). "Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions." *Journal of Dairy Science* **95**(1): 1-8.
- Rutherford, K. J. y Gill, H. S. (2000). "Peptides affecting coagulation." *British Journal of Nutrition* **84 Suppl. 1**: S99-S102.
- Saito, T. y Itoh, T. (1992). "Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine κ -casein A." *Journal of Dairy Science* **75**: 1768-1774.
- Silva-Hernández, E., Nakano, T. y Ozimek, L. (2002). "Isolation and analysis of κ -casein glycomacropeptide from goat sweet whey." *Journal Agricultural and Food Chemistry* **50**: 2034-2038.
- Sosa, M. B., C. (2009). "Metabolismo del Calcio y Biodisponibilidad de las sales de uso más frecuente." *Industria-farmaceutica*.
- Soto, A. M., Morales, P., Haza, A. I., García, M. L. y Selgas, M. D. (2014). "Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells." *Food Research International* **55**(0): 263-270.
- Straub, D. A. (2007). "Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications." *Nutrition in Clinical Practice* **22**: 286-296.
- Sun, N., Wu, H., Du, M., Tang, Y., Liu, H., Fu, Y., y col. (2016). "Food protein-derived calcium chelating peptides: A review." *Trends in Food Science & Technology* **58**: 140-148.
- Taberna, M. Á. (2014). "Lactosuero: de desecho industrial a producto con valor agregado." <http://inta.gob.ar/noticias/lactosuero-de-desecho-industrial-a-producto-con-valor-agregado>."
- Talbo, G. H., Suckau, D., Malkoski, M. y Reynolds, E. C. (2001). "MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide." *Peptides* **22**(7): 1093-1098.
- Taylor, C. M. y Woonton, B. W. (2009). "Quantity and carbohydrate content of glycomacropeptide fractions isolated from raw and heat-treated milk." *International Dairy Journal* **19**(12): 709-714.
- Thöma-Worringer, C., Siegert, N. y Kulozik, U. (2007). "Foaming properties of caseinomacropeptide -II. Impact of pH and ionic strength." **62**(3): 253-255.
- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J. y López-Fandiño, R. (2006). "Health effects and technological features of caseinomacropeptide." *International Dairy Journal* **16**(11): 1324-1333.
- Thomä, C., Krause, I. y Kulozik, U. (2006). "Precipitation behaviour of caseinomacropeptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC." *International Dairy Journal* **16**(4): 285-293.
- Titchenal, A. D., Jonnie. (2007). "A system to assess the quality of food sources of calcium." *Journal of Food Composition and Analysis* **20**(8): 717-724.
- Tolkach, A. y Kulozik, U. (2005). "Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques." *Journal of Food Engineering* **67**(1-2): 13-20.
- Torresani, M. E. (2007). "Enfoque nutricional en la prevención de la osteoporosis." *Actualizaciones en Osteología* **3**(2): 76-80.
- Van Calcar, S. C. y Ney, D. M. (2012). "Food products made with glycomacropeptide, a low-phenylalanine whey protein, provide a new alternative to amino Acid-based medical foods for nutrition management of phenylketonuria." *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* **112**(8): 1201-1210.
- Vavrusova, M., Liang, R. y Skibsted, L. H. (2014). "Calcium nutrition. Bioavailability and fortification." *LWT - Food Science and Technology* **59**(2): 1198-1204.
- Veldhorst, M. A. B., Nieuwenhuizen, A. G., Hochstenbach-Waelen, A., Westerterp, K. R., Engelen, M. P. K. J., Brummer, R.-J. M., y col. (2009). "Effects of complete whey-

- protein breakfasts versus whey without GMP-breakfasts on energy intake and satiety." *Appetite* **52**(2): 388-395.
- Von Staszewski, M., Jara, F. L., Ruiz, A. L. T. G., Jagus, R. J., Carvalho, J. E. y Pilosof, A. M. R. (2012). "Nanocomplex formation between b-lactoglobulin or caseinomacropéptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity." *Journal of Functional Foods* **4**(4): 800-809.
- Wang, L., Ding, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Luo, X., y col. (2018). "Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination." *Food Chemistry* **239**: 416-426.
- Wang, T. y Lucey, J. A. (2003). "Use of Multi-Angle Laser Light Scattering and Size-Exclusion Chromatography to Characterize the Molecular Weight and Types of Aggregates Present in Commercial Whey Protein Products." *Journal of Dairy Science* **86**(10): 3090-3101.
- Wang, X., Gao, A., Chen, Y., Zhang, X., Li, S. y Chen, Y. (2017). "Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization." *Food Chemistry* **229**: 487-494.
- Wasserman, R. H. (2004). "Vitamin D and the Dual Processes of Intestinal Calcium Absorption." *J Nutr* **134**: 3137-3139.
- Wyshak, G. (2000). "Teenaged Girls, Carbonated Beverage Consumption, and Bone Fractures. ." *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* **154**: 610-613.
- Xu, S. P., Mao, X. Y., Ren, F. Z. y Che, H. L. (2011). "Attenuating effect of casein glycomacropéptide on proliferation, differentiation, and lipid accumulation of in vitro Sprague-Dawley rat preadipocytes." *Journal of Dairy Science* **94**(2): 676-683.
- Yuleivys, O., Escobar, A. y Ponce, P. (2002). "Caseinomacropéptido bovino: una alternativa para la salud." *Rev. Salud Anim.* **24**(2): 73-81.
- Zhang, K., Li, J., Hou, H., Zhang, H. y Li, B. (2019). "Purification and characterization of a novel calcium-binding decapeptide from Pacific cod (*Gadus Macrocephalus*) bone: Molecular properties and calcium chelating modes." *Journal of Functional Foods* **52**: 670-679.
- Zong, H., Peng, L., Zhang, S., Lin, Y. y Feng, F. (2012). "Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides." *European Food Research and Technology* **235**(5): 811-816.

OBJETIVOS

Objetivo general.

- ❖ Caracterizar el desempeño del CMP como potencial ligante de calcio.

Objetivos específicos.

- ❖ Explorar la interacción entre el CMP y las sales de calcio (CaCl_2 y CaAc_2) a pH neutro a través de su comportamiento al flujo, su asociación molecular y sus espectros FTIR.
- ❖ Explorar la interacción entre el CMP y las sales de calcio (CaCl_2 y CaAc_2) a pH 3,5 a través de su dinámica de gelificación, propiedades texturales, color y sus espectros FTIR.
- ❖ Evaluar la capacidad ligante de calcio del CMP por diversas técnicas e interpretar el mecanismo de interacción entre el CMP y el CaCl_2 .
- ❖ Evaluar la inhibición de la precipitación de sales de calcio (CaCl_2 y CaCO_3) por el CMP en un medio alcalino simulando el pH y la fuerza iónica del intestino (buffer fosfato pH 8) y analizar el efecto del CMP en la solubilidad acuosa de sales de uso terapéutico (Ca_3Cit_2 y CaLac_2).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Caseinomacropéptido (CMP)

El caseinomacropéptido (CMP) fue provisto por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, USA), bajo la marca comercial BioPURE-GMP®.

La composición según el proveedor fue: 86,3% de CMP, 0,6% de grasa, 6,3% de ceniza y 6,4% de humedad. El grado de glicosilación es de alrededor del 50% (dato proporcionado por el proveedor). El valor de pH del CMP luego de su disolución en agua ultrapura fue de 6,6.

1.1.1. Determinación de la composición nutricional del CMP

El contenido de humedad, proteínas, lípidos y cenizas del caseinomacropéptido fue determinado según los Métodos Oficiales de Análisis de la A.O.A.C Internacional, edición 2019 (AOAC, 2019). El contenido de hidratos de carbono se calculó por diferencia.

- **Humedad**

La determinación de humedad se realizó a través del método indirecto por estufa. El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa por evaporación del agua de la muestra desecada hasta peso constante en estufa de aire. La muestra ($3 \pm 0,001$ g) se secó en estufa (San Jor, Argentina) durante dos horas a 105°C . El porcentaje de humedad se calculó por la diferencia de peso medido antes y después del calentamiento de la muestra. El ensayo se realizó por triplicado. El porcentaje de agua se calculó utilizando la **Ecuación 1**:

$$H (\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

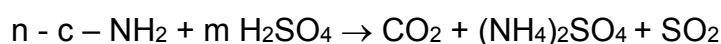
donde, m_0 es la masa de la capsula de Petri vacía (g); m_1 es la masa de la capsula de Petri con la muestra húmeda (g) y m_2 es la masa de la capsula de Petri con sólidos luego de la evaporación (g).

El contenido de humedad determinado por esta técnica fue de $8,3 \pm 0,5$ %.

- **Proteínas**

La determinación del contenido de proteínas se realizó por el método de Kjeldahl. Este método sirve para determinar el contenido de nitrógeno total y consta de tres etapas: *digestión* – *destilación* – *titulación*. En la *digestión* se produce la descomposición del nitrógeno contenido en las muestras orgánicas. Para ello, la muestra se hierve en una solución de ácido sulfúrico concentrado en presencia de la mezcla catalizadora K₂SO₄ anhidro y Cu₂SO₄·5H₂O (Biopack, Argentina) en relación 10:1 en un digestor (J.P. SELECTA, Barcelona, España). El resultado es una solución de sulfato de amonio.

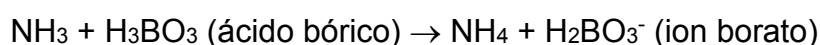
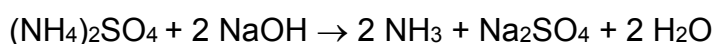
catalizadores →



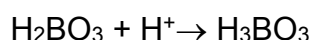
proteína

calor →

En la etapa de *destilación* se libera amoníaco, el cual es retenido en una solución conocida de ácido bórico. Inicialmente se realiza una destilación con vapor por el método de arrastre con vapor de agua, mediante la cual se acelera la obtención del destilado. Se destiló empleando NaOH 32% p/v en un equipo semiautomático (J.P. SELECTA, Barcelona, España), sobre 50 ml de H₃BO₃ 4% p/v en presencia de indicador de Mortimer.



Al final, se utiliza la *titulación* para valorar la cantidad de amonio presente en la muestra destilada.



Se valoró directamente el borato de amonio formado utilizando HCl 0,1032 N. Se realizó un blanco para evaluar la posible presencia de compuestos nitrogenados en los reactivos empleados.

El porcentaje de nitrógeno se calculó empleando la **Ecuación 2**:

$$N (\%) = \frac{(V_m - V_b)}{m} * N_{HCl} * P_{meq} * 100$$

Ecuación 2

donde, V_m es el volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra (ml); V_b es el volumen de HCl gastado en la titulación del blanco (ml); N_{HCl} es la normalidad del HCl; P_{meq} es el peso miliequivalente del nitrógeno (g/meq) y m es la masa de la muestra (g).

Para estimar el contenido de proteínas se multiplicó el porcentaje de nitrógeno por el factor de conversión $f = 6,38$ g proteína/g nitrógeno, usualmente empleado para el suero en polvo. Las determinaciones se realizaron por triplicado.



Figura 11. Equipo de digestión y destilación Khedjal. Laboratorio de Nutrición y Bromatología, Universidad Nacional de Luján, Sede Central.

El contenido de nitrógeno hallado fue de $73,1 \pm 2,4$ %.

- **Lípidos**

La determinación de lípidos se realizó por el método de extracción de Soxhlet, empleando una mezcla de solventes orgánicos en un equipo de Soxhlet (**Figura 10**). Los lípidos del péptido fueron extraídos con una mezcla de éter de petróleo (fracción 30-60°) y éter dietílico en relación 1:1 llevando a cabo siete sifonadas para lograr una extracción completa. Una vez finalizada la misma, se obtuvo gravimétricamente el extracto etéreo luego de evaporar el solvente. Las determinaciones se realizaron por triplicado. El porcentaje de lípidos se calculó empleando la **Ecuación 3**:

$$L (\%) = \frac{(m_1 - m_0)}{m} * 100$$

Ecuación 3

donde, m_1 es la masa del balón con extracto etéreo luego de evaporar el solvente (g); m_0 es la masa del balón vacío (g) y m es la masa de la muestra (g);



Figura 12. Equipo de extracción de Soxhlet. Laboratorio de Nutrición y Bromatología, Universidad Nacional de Luján, Sede Central.

El contenido de grasa hallado fue despreciable.

- **Cenizas**

El contenido de cenizas fue determinado por el método por incineración directa en mufla basado en la oxidación completa de la materia orgánica, quedando las cenizas en el residuo. Una muestra de $(5,0000 \pm 0,0001)$ g de CMP en polvo se colocó en una cápsula de porcelana previamente calcinada y pesada. Se carbonizó con mechero en triangulo de pipa y luego se calcinó a 550°C hasta obtención de residuo blanquecino y peso constante. La determinación se realizó por triplicado. El cálculo del contenido de cenizas se realizó utilizando la **Ecuación 4**:

$$C (\%) = \frac{(m_1 - m_0)}{m} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde, m_0 es la masa de la capsula de porcelana vacía (g); m_1 es la masa de cápsula con residuo inorgánico obtenido luego de calcinar la muestra (g) y m es la masa de la muestra (g).

El contenido de cenizas determinado fue de $6,157 \pm 0,001$ %.

- **Hidratos de carbono**

El contenido de hidratos de carbono del CMP se calculó por diferencia de los demás componentes determinados y fue del 12,4%:

$$\text{HC} (\%) = 100 - \text{Humedad} (\%) - \text{Proteínas} (\%) - \text{Lípidos} (\approx 0\%) - \text{Cenizas} (\%)$$

$$\text{HC} (\%) = 100 - 8,3 - 73,1 - 6,2 = 12,4 \%$$

- **Composición mineral**

La determinación de la composición de minerales del CMP se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica (EAA). La composición de minerales para 100 g de muestra fue: 950 mg de Na; 125 mg de K y 682 mg de Ca.

1.2. Sales de Calcio

• Cloruro de calcio

El cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) utilizado fue marca Merck (Alemania). Solubilidad: 740 g/l y grado de pureza del 98%.

• Acetato de calcio

El acetato de calcio monohidratado ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), denominado CaAc_2 de aquí en más, fue marca Merck (Alemania). Solubilidad: 400 g/l y grado de pureza del 94%.

• Carbonato de calcio

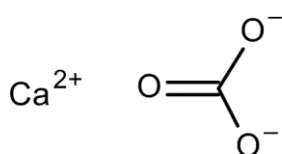
El carbonato de calcio (CaCO_3), fue marca Biopack (Argentina) con una pureza del 98% y solubilidad 0,017 g/l.

• Citrato de calcio

El citrato de calcio [$\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], denominado Ca_3Cit_2 de aquí en adelante, fue marca Fluka S.A. (Argentina) con un 99,5% de pureza y una solubilidad de 0,9 g/L.

• Lactato de calcio

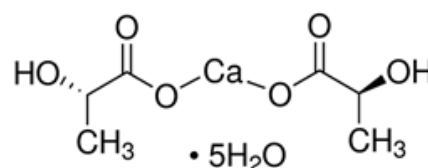
El L-lactato de calcio pentahidratado [$\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$], denominado CaLac_2 de aquí en adelante, fue marca Sigma-Aldrich (Argentina) con una pureza del 98,1% y una solubilidad de 50 g/l.



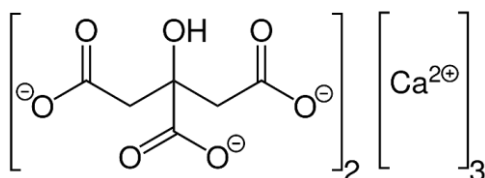
Carbonato de calcio



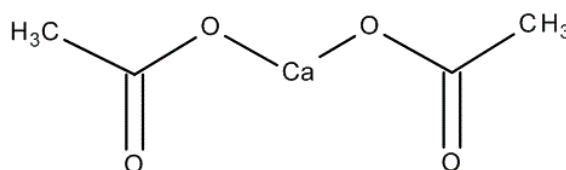
Cloruro de calcio



Lactato de calcio pentahidratado



Citrato de calcio



Acetato de calcio

Figura 13. Fórmula estructural de las sales de calcio utilizadas en esta tesis.

1.3. Preparación de las soluciones

La preparación de las soluciones fue diferente según el tipo de estudio. El agua utilizada para preparar las soluciones fue ultrapura y se obtuvo mediante un sistema de purificación (Thermo Scientific Barnstead, modelo Easypure RF, **Figura 14**) y su conductividad fue $1,8 \pm 0,1 \mu\text{S/cm}$.

Las soluciones de CMP fueron preparadas disolviendo la cantidad apropiada de polvo en agua ultrapura a temperatura ambiente y con agitación constante durante 30 minutos o una hora dependiendo de la concentración y luego almacenadas bajo refrigeración (4°C) durante 24 h previo a su uso. Se utilizó sal azida de sodio (NaN_3) 0,02% (p/p) como antimicrobiano. En las soluciones de CMP utilizadas en los estudios de dispersión dinámica de luz láser y espectroscopía FTIR no se adicionó azida de sodio. Cuando fue necesario, el pH se ajustó utilizando HCl o NaOH de alta normalidad para evitar dilución. El ajuste de pH con ácidos acético, láctico, fosfórico y cítrico también se realizó con soluciones de alta normalidad.

Las soluciones de CMP con sales (cloruro de calcio, acetato de calcio, citrato de calcio, lactato de calcio, carbonato de calcio) se prepararon agregando a la solución de CMP la cantidad apropiada de sal en solución concentrada.

El CMP es altamente soluble en agua y no se formó ningún precipitado después de agregar soluciones de sal (excepto en el caso del carbonato de calcio, que es una sal muy insoluble).



Figura 14. Sistema de purificación de agua. Laboratorio avanzado de alimentos, Universidad Nacional de Luján, Sede Central.

2. Métodos

2.1. Medición de pH

El pH de las soluciones de CMP se determinó con un medidor de pH (HI 98191, Hanna Instruments, Italia). El electrodo de pH fue calibrado usando soluciones buffer de pH 10, 7 y 4. Los ensayos se realizaron por triplicado.



Figura 15. Medidor portátil de pH, Hanna Instruments, modelo HI 98191.

2.2. Mediciones reológicas

- **Análisis de flujo**

Las determinaciones reológicas se realizaron en un reómetro oscilatorio dinámico con esfuerzo de corte controlado (Physica MCR 301, Anton Paar, Alemania) (**Figura 16**). Se utilizó un sistema de cono y plato CP50 (50 mm de diámetro, 1° de ángulo de cono y 1 mm de separación o gap). Se colocó 570 μ l de muestra en el plato del instrumento. La temperatura fue controlada por un baño de agua en combinación con un sistema de calentamiento (Peltier Viscotherm VT2, Paar Physica). Luego de colocar la muestra, se aplicó silicona líquida en el borde del plato con el objetivo de prevenir la evaporación de agua de la muestra en aquellos ensayos donde la temperatura excedió los 25 °C. Los experimentos fueron realizados por triplicado.



Figura 16. Reómetro de esfuerzo de corte controlado Anton Paar, Laboratorio avanzado de alimentos, Universidad Nacional de Luján, Sede Central.

Los ensayos de flujo constante de las soluciones acuosas de CMP a distintas concentraciones de 1 a 15 % (p/p) se llevaron a cabo usando una rampa de velocidad de deformación lineal de 0 a 300 s⁻¹ en un rango de temperatura de 5 a 70 °C. El esfuerzo de corte (τ) y la viscosidad aparente (η) se registraron en función de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$). Los datos experimentales se ajustaron con el modelo de Herschel-Bulkley (**Ecuación 5**) con buenos ajustes del coeficiente de determinación ($R^2 > 0,998$):

$$\tau = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación 5}$$

donde, τ es el esfuerzo de corte; τ_0 es el esfuerzo de corte inicial; K es el índice de consistencia; $\dot{\gamma}$ es la tasa de corte y n el índice de comportamiento de flujo.

La energía de activación de flujo (Ea) refleja la dependencia de la viscosidad frente a los cambios de temperatura (Karataş y Arslan, 2016). Se eligió estudiar la Ea a la viscosidad aparente de 100 s^{-1} (η_{100}) y los datos reológicos se ajustaron al modelo de Arrhenius (**Ecuación 6**) (Arogundade y col., 2011; Chen y col., 2014; Ma y col., 2014; Ni y col., 2016). La Ea se determinó a partir del valor de η_{100} vs T^{-1} .

$$\eta = \eta_T e^{\frac{Ea}{RT}} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde, Ea es la energía de activación de flujo (kJ/mol); T es la temperatura absoluta (K); R es la constante universal de los gases ($8,314 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$); η_T es una constante experimental (Pa).

- **Dinámica de gelificación**

La reología dinámica es una técnica que involucra pequeñas deformaciones por lo cual es de suma utilidad para el estudio de la transición sol-gel y para la caracterización del comportamiento viscoelástico de los geles en la “región lineal”, en la cual las amplitudes de deformaciones y esfuerzos son suficientemente bajos para asegurar la proporcionalidad deformación-esfuerzo (Baeza, 2003).

Las pruebas se realizaron en modo automático para garantizar la constancia en cada velocidad de deformación alcanzada y con una geometría cono plato PP25 con un gap de 1 mm. La frecuencia fue de 1 Hz y la deformación de 0,01%, estas condiciones corresponden a la región viscoelástica lineal. Inmediatamente luego de ajustar el pH a 3,5, se vertieron 490 μl de muestra en el plato del reómetro. La temperatura fue controlada por un sistema Peltier (Viscotherm VT2, Paar Physica). Las muestras fueron rápidamente calentadas desde 25°C hasta 70°C en un minuto para simular un calentamiento isotérmico. Se eligió la temperatura de 70°C con el objeto de acelerar los ensayos según Martínez y col. (2011). El ensayo duró 40 minutos, tiempo suficiente para permitir que G' alcance el equilibrio. Luego se enfrió el sistema a 25°C en 10 min.

Se registró la evolución de G' , G'' y la tangente del ángulo de pérdida, $\tan \delta$. La transición de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) durante el calentamiento es determinada por el punto de cruce entre G' y G'' , momento en el cual el ángulo de desfase, δ , es de 45° y la $\tan \delta$ es igual a 1. Luego de este punto de cruce o “punto gel”, G' asciende notoriamente y se observa el consecuente descenso de la $\tan \delta$. El tiempo en el cual ocurre el punto de gel se denomina tiempo de gel (t_{gel}).

- **Propiedades viscoelásticas de los geles**

Las propiedades viscoelásticas del gel formado se midieron en función de la frecuencia de oscilación entre 0,05 y 10 Hz a 25°C con una deformación de 0,01% (Farías y Pilosof, 2016). El grado de dependencia de G' con la frecuencia puede ser expresado por medio de la constante n según la **Ecuación 7** (Stading y Hermansson, 1990):

$$\log G' = n \cdot \log f + K \quad \text{Ecuación 7}$$

donde, G' es el módulo elástico; f es la frecuencia de oscilación; K una constante y n el índice de flujo.

Para una respuesta elástica ideal, el esfuerzo resultante estará en fase con la deformación aplicada y para un material viscoso ideal, la respuesta estará desfasada en 90° respecto a la deformación aplicada. En un experimento de reología dinámica oscilatoria, la relación entre la deformación y el esfuerzo está descrita por el módulo complejo (**Ecuación 8**):

$$G^* = G' + i G'' \quad \text{Ecuación 8}$$

donde, G' es el módulo de almacenamiento o elástico; G'' es el módulo de pérdida o viscoso. G' da una idea de la energía almacenada en la red tridimensional y G'' de la energía disipada por la muestra en forma de flujo. La tangente de pérdida, $\tan \delta$, es la relación entre el módulo viscoso y el elástico, G''/G' , e indica la viscoelasticidad relativa del material. El ángulo de desfase δ señala su carácter viscoelástico.

2.3. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Introducción

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés: Dynamic Light Scattering), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones, es una técnica que brinda información cuantitativa sobre la asociación de las moléculas proteicas. La intensidad de dispersión de luz de una partícula es proporcional a su *diámetro*⁶. Por lo tanto, es una herramienta útil para medir formas asociadas o agregadas de las proteínas y la presencia de impurezas, aún a bajas concentraciones. Además, es un método no invasivo que permite monitorear el tamaño de partícula en tiempo real y por lo tanto se puede analizar cómo evoluciona una muestra ante diferentes efectos.

Fundamento

El fundamento de la medición se basa en el movimiento Browniano de las partículas, que se debe a la colisión al azar de las moléculas del líquido que rodean a la partícula. Las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las grandes lo hacen más lentamente. La muestra se coloca en una celda de poliestireno para las mediciones realizadas a temperatura ambiente o de vidrio para las mediciones sometidas a tratamiento térmico. Luego, es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente de su tamaño y es registrada por un detector óptico. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones se correlaciona con el coeficiente de difusión (D) de la partícula y a partir de éste se obtiene el tamaño de la partícula. La relación entre este último y el coeficiente de difusión se define por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi \eta D} \quad \text{Ecuación 9}$$

donde, $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico (m); D es el coeficiente de difusión traslacional ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$); k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ N m K}^{-1}$); T es la temperatura absoluta (K) y η es la viscosidad del solvente (N s m^{-2}).

El tamaño de partícula se obtiene a partir del ajuste de dos aproximaciones: CONTIN y Cumulantes.

- Análisis de Cumulantes: se ajusta una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o “Z– average”) y una estimación del ancho de la distribución (índice de polidispersidad). El índice de polidispersidad refleja el grado de asociación (Haque, 1993, 1997). Los resultados que se obtienen mediante este análisis son aplicables con propósitos de comparación de un simple valor, pero es inadecuado para dar una completa descripción de los resultados de la distribución en sistemas polidispersos.
- Análisis de CONTIN: se ajusta una exponencial múltiple a la función de correlación para obtener la distribución porcentual de tamaños de partículas (Stepanek, 1993). La distribución de tamaño obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas en varias clases de tamaños y por lo tanto se define como distribución de tamaño por intensidad. Aunque la distribución de tamaño fundamental generada por el equipo es la distribución por intensidad, ésta se puede convertir, mediante la teoría de Mie (1908), a distribución por volumen con el objetivo de analizar la importancia de los diferentes picos en relación a la cantidad de partículas que lo conforman.

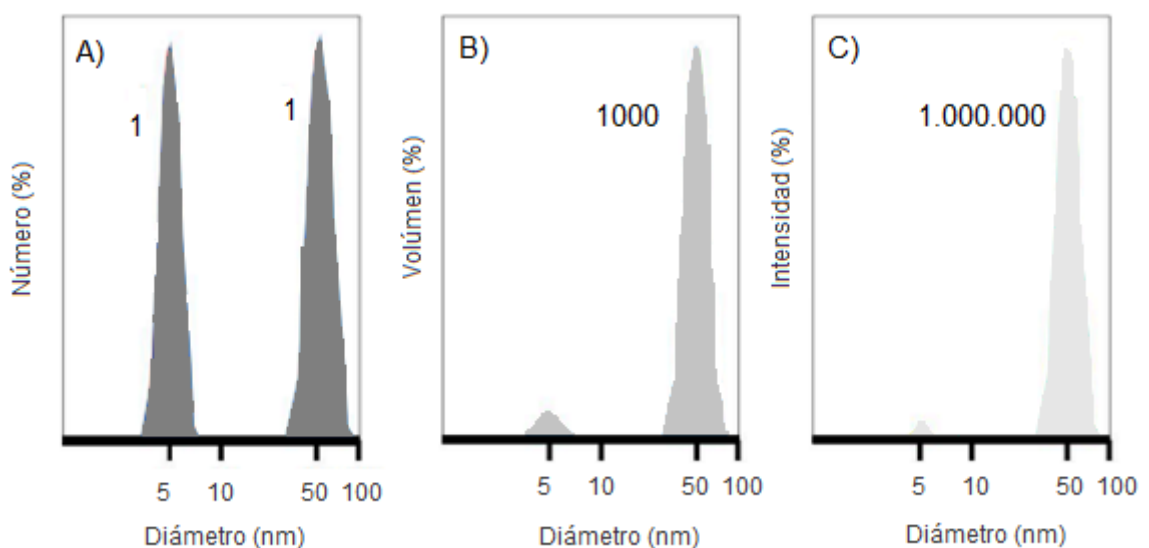


Figura 17. Distribución en número (A), volumen (B) e intensidad (C) de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm presentes en igual cantidad (Malvern-Instruments).

Un ejemplo útil y simple utilizado (Malvern-Instruments) para describir las diferencias entre las distribuciones de tamaño de partícula por intensidad, volumen y número es considerar dos poblaciones de partículas esféricas de 5 y 50 nm de diámetro presentes en igual cantidad. Si se grafica una distribución de número de estas dos poblaciones de partículas, el gráfico consistirá en dos picos (ubicados a 5 y 50 nm) obteniendo una relación 1:1 (**Figura 17 A**). Si en cambio se grafica una distribución en volumen (**Figura 17 B**), entonces la relación de estos dos picos cambia a 1:1000 (porque el volumen de una esfera es $\frac{4}{3}\pi(d/2)^3$). Por último, si quisiéramos graficar una distribución de intensidad (**Figura 17 C**), la relación entre los dos picos sería de 1:1000000 (porque la intensidad de dispersión es proporcional al *diámetro*⁶ a partir de la aproximación de Rayleighs) (Malvern-Instruments).

Es importante recordar que, en DLS, la distribución que se obtiene es en intensidad y que las distribuciones de volumen y número son obtenidas a partir de ésta, de aquí la importancia de que la lectura del tamaño de partícula se haga a partir de la distribución en intensidad. En este trabajo se analizarán en conjunto las distribuciones en intensidad y en volumen, ya que da una visión más amplia de la importancia de los picos. La distribución en número no se evaluará ya que arrastra muchos errores a partir de su cálculo y no aporta información extra.



Figura 18. Equipo de dispersión dinámica de luz láser, Zetasizer Nano–Zs, Malvern Instruments, Dto. de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Dispositivo experimental

Las mediciones de tamaño de partícula fueron realizadas en un equipo de DLS Zetasizer Nano–Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra) como el que se observa en la **Figura 18** provisto de un láser He–Ne (633 nm) y un correlador digital, modelo ZEN3600. Las mediciones fueron realizadas a un ángulo fijo de dispersión de 173°. El rango de medición del equipo es 0,6–6000 nm. Los ensayos fueron realizados por triplicado y a temperatura ambiente. Las muestras fueron previamente filtradas a través de microfiltros Whatman International Ltd. (Maidstone, Inglaterra) de 0,45, 0,22 y 0,02 μm . Las mediciones de tamaño de partículas se informan como el promedio y la desviación estándar de al menos tres mediciones.

2.4. Colorimetría

La medición del color en unidades CIE (L^* , a^* , b^*) de las muestras se realizó con un colorímetro portátil MiniScan® EZ (Hunter Lab, Reston, VA, USA) (**Figura 19**). Las muestras se midieron en recipientes plásticos transparentes de 3,8 cm de altura y 2,9 cm de diámetro sobre un fondo blanco. Para calibrar el colorímetro se usó una placa blanca estándar N.º MESEZ0866. El escaneo de cada muestra se realizó 3 veces, obteniendo los parámetros del color L^* , a^* y b^* . Las determinaciones se realizaron por cuádruplicado.



Figura 19. Colorímetro portátil MiniScan® EZ, Hunter Lab y espacio de color con los parámetros L^* , a^* y b^* .

El índice de blanco (IB) se calculó según la **Ecuación 10** (Zhu y col., 2009; Paker y Matak, 2015):

$$\text{Índice de blanco (IB)} = 100 - [(100 - L)^2 + a^2 + b^2]^{1/2} \quad \textbf{Ecuación 10}$$

donde, L es la luminosidad (escala de 0 a 100); a es la intensidad de color desde el verde al rojo (escala de -60 a 60); b es la intensidad de color desde el azul al amarillo (escala de -60 a 60).

Para el caso de las muestras gelificadas, se analizó también el ΔE , que es la diferencia de color antes y después de gelificar y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2]^{1/2} \quad \textbf{Ecuación 11}$$

donde, ΔL es la diferencia de luminosidad antes y después de gelificar; Δa es la diferencia de intensidad de color verde/rojo antes y después de gelificar y Δb es la diferencia de intensidad de color azul/amarillo antes y después de gelificar.

2.5. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Introducción

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una metodología instrumental basada en la absorción de la radiación emitida de las vibraciones entre los átomos de una molécula y provee información acerca de la composición y conformación de la estructura de los compuestos (Willard, 1981). Es una técnica no destructiva, rápida, que no emplea reactivos químicos y requiere poca cantidad de muestra (~ 100 µg). Dos compuestos no producen exactamente el mismo espectro IR debido a que cada material es único en su composición y por consiguiente tienen diferente disposición de átomos. Por lo tanto, la espectroscopia FTIR puede ser utilizada también para identificar cualquier tipo de material (análisis cualitativo) (Dutta, 2017). Por medio de esta técnica se pueden investigar estructuras de proteínas en una variedad de entornos, incluyendo medios ópticamente turbios o sistemas que son notoriamente difíciles de estudiar por otros métodos espectroscópicos (Arrondo y col., 1993; Surewicz y col., 1993).

Fundamento

La espectroscopía infrarroja se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Esencialmente la energía de la radiación, localizada en determinada longitud de onda del infrarrojo, es absorbida por una molécula (o parte de ella) que se encuentra vibrando en su estado basal a la misma longitud de onda que la radiación infrarroja incidente, provocando con ello un cambio en la intensidad de la vibración. La **Ecuación 12** define a la transmitancia (T) como la relación entre la potencia radiante transmitida (I) y la potencia radiante incidente en la muestra (I_0). La absorbancia (A) es el logaritmo en base 10 de la inversa de la transmitancia.

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = -\log_{10} T = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad \text{Ecuación 12}$$

La presencia de momentos dipolares es una condición necesaria para que se produzca una vibración en una molécula al incidir sobre ella un haz de energía infrarroja (Skoog, 1998). El momento dipolar de dicha molécula cambia cuando un enlace se contrae o se expande. Cuanto mayor sea el cambio, más intensa será la banda de absorción. Las interacciones de la radiación infrarroja con la materia deben ser entendidas en términos de cambios en momentos dipolares asociados con movimientos vibratorios y de rotación.

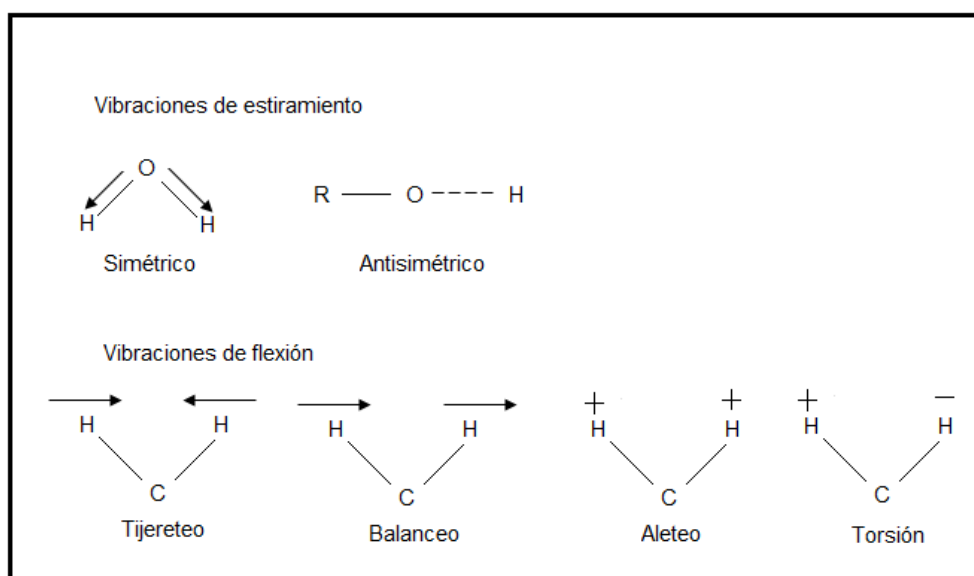


Figura 20. Distintos modos de vibración en moléculas de los tipos estiramiento y flexión.

Las vibraciones pueden implicar tanto una variación en la longitud del enlace (stretching o estiramiento) como un cambio en el ángulo del mismo (bending o flexión). Algunos enlaces pueden estirarse en fase (estiramiento simétrico) o fuera de fase (estiramiento antisimétrico). Estos modos están representados en la **Figura 20** junto a los distintos modos de flexión (Skoog, 1998).

En un espectro de FTIR se distinguen principalmente dos porciones (**Figura 21**): una región de huella digital o fingerprint (600 - 1300 nm^{-1}) y otra región correspondiente a los grupos funcionales (1300 - 4000 nm^{-1}). Esta última región da información para identificar el tipo y carga de los grupos, mientras que la región de la huella digital indica la característica y estructura de la molécula (Wang y col., 2017).

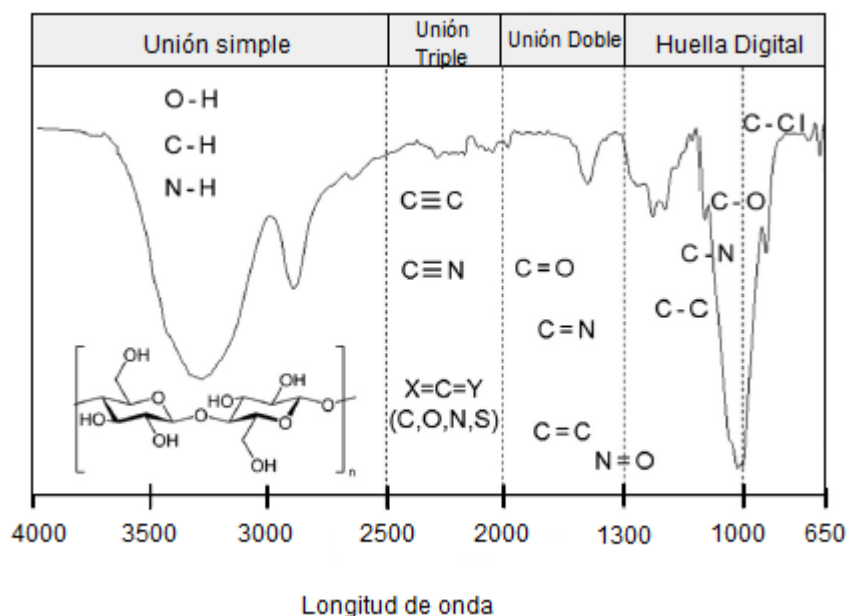


Figura 21. Espectro FTIR típico de membrana de celulosa con los tipos de enlaces más comunes y las regiones de absorción aproximadas. (Mohamed, 2017)

Preparación de las muestras

Las muestras en solución fueron almacenadas en freezer a una temperatura de -80°C durante 24 hs y posteriormente liofilizadas (Labconco ® freezone 12) por 48 hs hasta obtener una muestra sólida.

Mediciones en espectrofotómetro FTIR

Los espectros fueron registrados a temperatura ambiente en un espectrofotómetro infrarrojo Shimadzu® (modelo IR Prestige-21, Japón) (**Figura 22**) en un rango de longitud de onda de 4000 nm^{-1} a 400 nm^{-1} . Se utilizó 1 mg de muestra liofilizada mezclada con 100 mg de KBr, pulverizada en un mortero de ágata y luego presionada a 20 Bar para obtener una pastilla. Cada muestra se sometió a 40 scans con $2,0\text{ cm}^{-1}$ de resolución. El procesamiento de datos se realizó con el software LabSolution IR®, y los espectros y los picos fueron analizados con el software OriginPro® 8 SR0, V8.0724, USA.

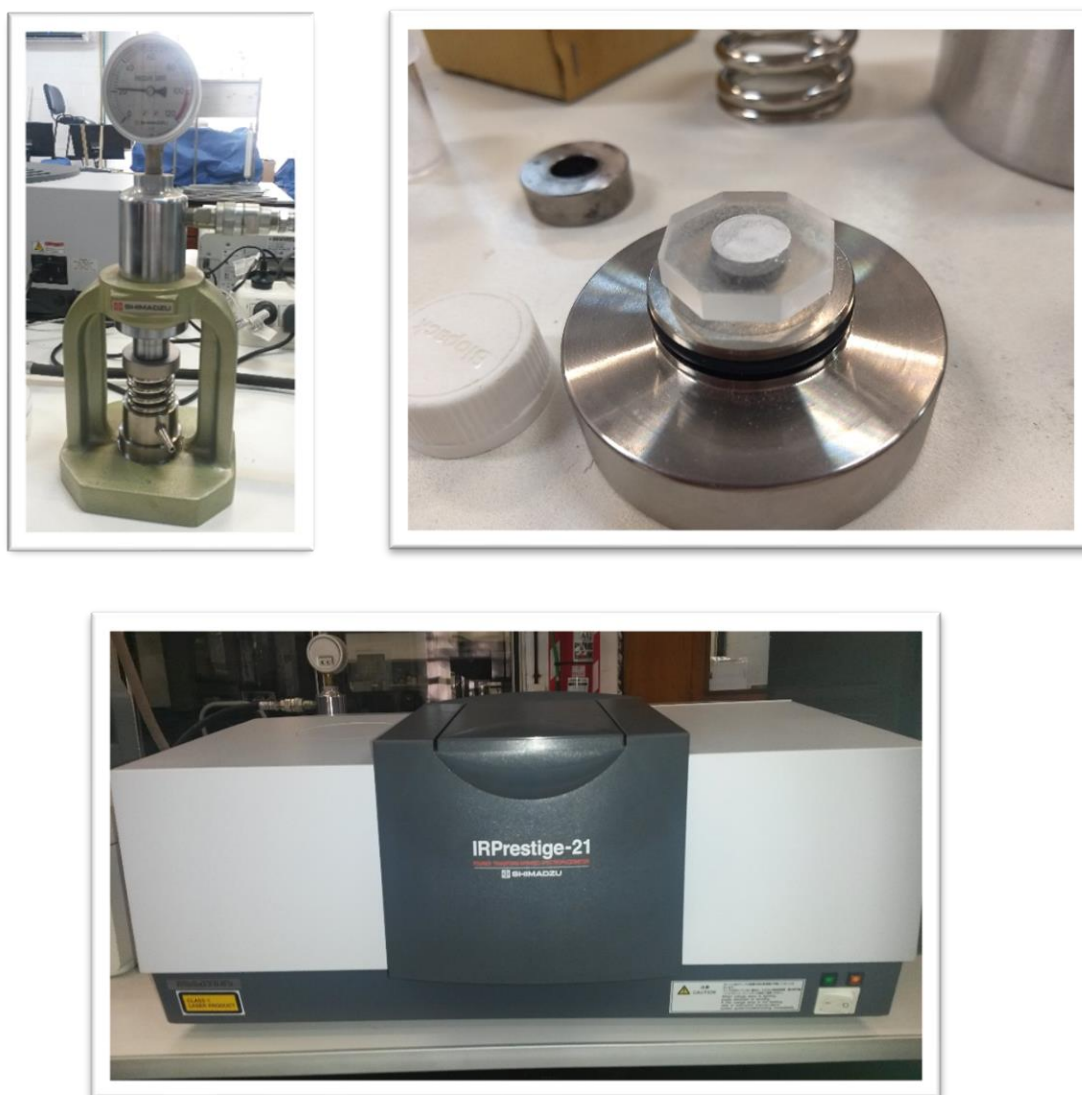


Figura 22. Arriba: Preparación de la pastilla de muestra en polvo y KBr. Abajo: Espectrofotómetro IR Prestige-21, marca Shimadzu, Sala de Equipos, Universidad Nacional de Luján, Sede Central.

2.6. Test de inclinación o “tilting test”

El tiempo de transición solución-gel se determinó por un test de inclinación modificado (Relkin y col., 1998). Se determinó la concentración de gelificación del CMP (12% p/p) en presencia de CaCl_2 , a diferentes concentraciones (0; 50; 100; 150; 200 y 250 mM), a pH 3,5 (acidificado con HCl 2N) y temperatura constante (de 30, 40, 50, 60 o 70 °C) controlada con un baño termostático y un termómetro de vidrio. Se colocaron 5 ml de muestra en tubos de ensayo que fueron sellados para evitar evaporación y luego colocados en el baño de agua a temperatura constante. A tiempos sucesivos se retiraron los tubos del baño y se observaron. Se determinó el tiempo de gelificación (t_{til}) como el tiempo necesario para que el menisco de la solución contenida en los tubos no fluya al inclinarlo. La velocidad de gelificación obtenida por este método se denominó V_{til} y se calculó como $1/t_{\text{til}}$. Los valores reportados fueron la media de triplicados. En el siguiente esquema (**Figura 23**) se muestra el procedimiento de obtención del punto gel y una foto del ensayo:

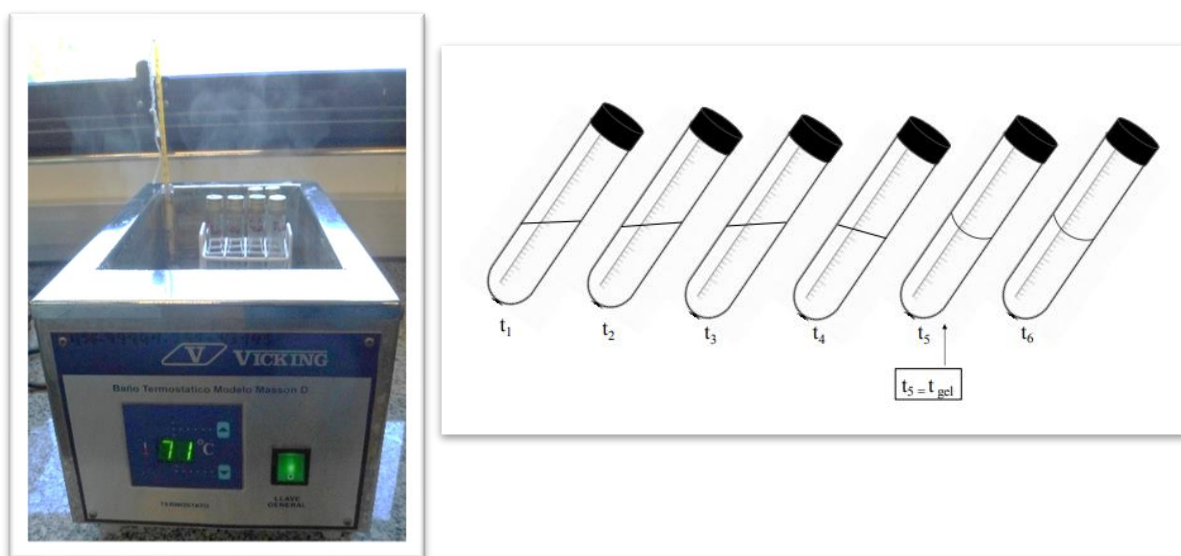


Figura 23. (Izq.) Fotografía del ensayo de tilting test. (Der.) Esquema del procedimiento de determinación del punto gel mediante el test de inclinación. En la figura se indican diferentes tiempos de observación y la determinación del t_{til} .

2.7. Textura de los geles

El análisis de perfil de textura (TPA) es un método objetivo que está basado en el reconocimiento de la textura como un atributo de múltiples parámetros. El mismo consiste en comprimir una pieza de alimento dos veces en un movimiento que simula la masticación con la mandíbula y ayuda a medir y cuantificar parámetros físico-mecánicos que se extraen de la curva resultante fuerza-tiempo (**Figura 24**). Se pueden distinguir parámetros primarios (por ejemplo, dureza, fracturabilidad, cohesividad, elasticidad) y parámetros secundarios calculados a partir de los primarios (masticabilidad y gomosidad).

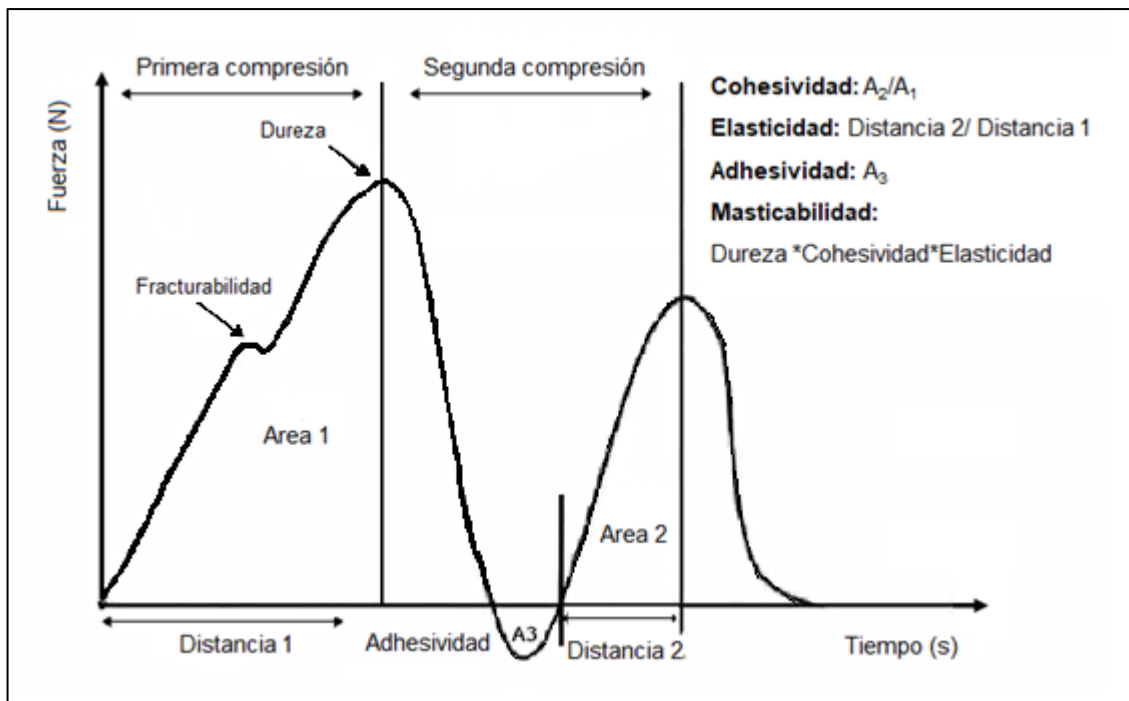


Figura 24. Esquema de un típico perfil de textura con un ciclo de compresión de dos mordidas.

PRIMARIOS:

- *Fracturabilidad* (N): es la fuerza máxima antes de producirse una caída en la curva de fuerza.
- *Dureza* (N): es la fuerza máxima de compresión en la primera mordida. Términos relacionados (blando, firme y duro).

- *Cohesividad* (sin unidades): fuerza de los enlaces internos que componen al producto. Se calcula como la relación entre las áreas A_2/A_1 . La cohesividad puede ser tomada como una medida de la velocidad con la que el material se desintegra bajo acción mecánica. Grado en el que la muestra se deforma antes de romperse cuando se muerde con los molares.
- *Adhesividad* (J): trabajo necesario para superar las fuerzas de atracción entre la superficie del alimento y la superficie de los otros materiales con los que el alimento entra en contacto. Es una propiedad de textura común que poseen productos de confitería, pastas alimenticias cocidas, productos de panadería crudos. Es el valor del área A_3 .
- *Elasticidad*: La elasticidad se define como la propiedad de un material por la que recupera su forma y dimensiones originales parcial o totalmente al cesar la acción del esfuerzo aplicado. Términos relacionados: plástico – elástico. Corresponde a la relación D_2/D_1 .

SECUNDARIOS:

- *Masticabilidad*: Términos relacionados (tierno, masticable). Se calcula a partir del producto de la dureza, la cohesividad y la elasticidad.
- *Gomosidad*: Energía necesaria para desintegrar un alimento semisólido a un estado apto para la deglución. Términos relacionados (harinoso, pastoso, gomoso).

Formación de geles

Los geles de CMP y diferentes concentraciones de CaCl_2 , o CaAc_2 se formaron a temperatura ambiente con 10 ml de muestra en recipientes herméticos y cilíndricos de plástico de 2,9 cm de diámetro y 3,8 cm de altura. El pH fue ajustado a 3,5 con HCl de alta normalidad. Como los geles de CMP no se autosoportaron, los ensayos de las propiedades texturales se realizaron en el mismo recipiente en el cual fueron preparados.



Figura 25. Texturómetro marca Texture Analyzer, modelo TA-XT2i. Laboratorio avanzado de alimentos, Universidad Nacional de Luján, Sede Central.

El análisis de perfil de textura (TPA) se realizó a 25 °C en un analizador de textura Texture Analyzer (modelo TA-XT2i; Stable Microsystems, Godalming, Reino Unido) (**Figura 25**) usando una sonda cilíndrica de ebonita (P/05 de 1,27 cm de diámetro). Los geles se comprimieron al 20% de la altura inicial a una velocidad de compresión de 0,5 mm s⁻¹. Los diferentes parámetros texturales (dureza, resiliencia, cohesividad y elasticidad) se obtuvieron con el software Texture Expert Exceed. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prims v7.0 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA), utilizando el test de Tukey.

2.8. Determinación de la fracción no dializable de calcio

Preparación de los materiales

La solución a dializar fue preparada a una concentración de CMP de 10 g/L y 20 mM CaCl_2 en agua ultrapura ($1,8 \pm 0,1 \mu\text{S/cm}$). Los materiales de vidrio utilizados (varillas, vasos de precipitado y pipetas aforadas) fueron lavados con EDTA 0,01N y luego enjuagados 5 veces con agua ultrapura (Roig y col., 1999). El hilo utilizado para sujetar la bolsa de diálisis fue previamente hervido en EDTA y luego lavado con agua ultrapura. La membrana de diálisis utilizada (Celulosa Ester de Biotech, MWCO: 100 – 500 Da, Spectrum Laboratories, Inc., USA) fue cortada en tiras de 20 cm y luego lavadas con agua ultrapura para limpiarlas de azida.

Armado de la bolsa de diálisis

Se transfirieron 5 ml de una solución de CMP 10 g/L y 20 mM CaCl_2 a una bolsa de diálisis y se sumergieron en 250 ml de agua ultrapura bajo agitación durante 24 hs y 20 °C para remover el Ca^{2+} libre (**Figura 26**). Los cambios del agua de diálisis se realizaron cada 8-10 hs. La concentración de calcio libre se determinó en el agua total (dializado) por espectroscopía de absorción atómica con un espectrofotómetro AAnalyst 200 Perkin Elmer (USA). Previamente se agregó nitrato de lantano (1,5% p/v) a estándares, muestras y blancos para evitar la interferencia de fosfatos. El blanco consistió en dializar 5 ml de CPM 10 g/L. Los ensayos se realizaron por duplicado. Los cálculos se encuentran en el Anexo I, al final del capítulo 3.



Figura 26. Ensayo de diálisis. Izq.: membrana de diálisis.

2.9. Espectroscopia por Absorción Atómica (EAA)

Introducción

La espectroscopia de absorción atómica de llama es el método más empleado para la determinación de metales en una amplia variedad de matrices. Su popularidad se debe a su especificidad, sensibilidad y facilidad de operación. En este método la muestra es directamente aspirada a una llama de flujo laminar. La llama tiene como función generar átomos en su estado fundamental de los elementos presentes en la solución muestra. Temperaturas cercanas a los 1.500 – 3.000 °C son suficientes para producir la atomización de un gran número de elementos, los que absorberán parte de la radiación proveniente de la fuente luminosa.

Fundamento Físico

La espectroscopia de absorción atómica (EAA), tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la Ley de Lambert-Beer (**Ecuación 13**) que relaciona la pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos absorbedores. La ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la misma, así como también la hay entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Si ℓ y ε son datos conocidos, la concentración de la sustancia puede ser deducida a partir de la cantidad de luz transmitida.

$$\frac{I_1}{I_0} = 10^{-\alpha \ell} = 10^{-\varepsilon \ell c} = 10^{-A} \quad \text{Ecuación 13}$$

donde, I_1 y I_0 son la intensidad de radiación incidente en un medio y transmitida después de que se produzca la absorción, respectivamente; A es la absorbancia; α es el coeficiente de absorción; ε es la absortividad molar; ℓ es la longitud atravesada por la luz en el medio y c es la concentración del absorbente.

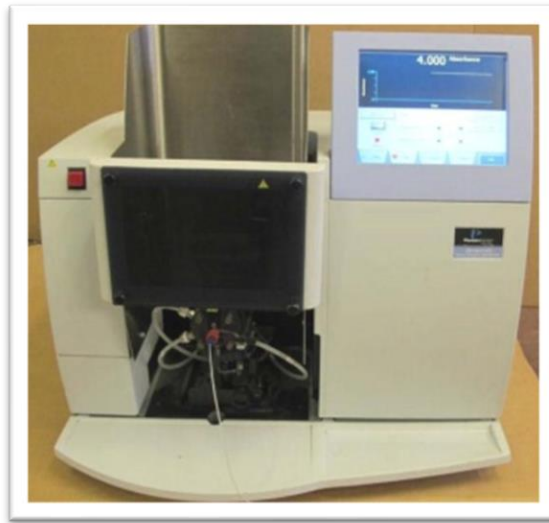


Figura 27. Espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 200 PerkinElmer (Shelton, CT, USA). Laboratorio Analítica I y II, Universidad Nacional de Luján, Sede Central.

En la **Figura 27** se muestra el equipo AAnalyst 200 PerkinElmer (Shelton, CT, USA) en el que se realizaron las determinaciones de calcio.

2.10. Medición de conductividad

La conductimetría es un método analítico basado en la conducción eléctrica de los iones en solución. Ésta consiste en la determinación de la conductividad, que es una medida de la concentración iónica total que tiene la solución.



Figura 28. Conductímetro Hanna Instruments, modelo HI2003-02.

La muestra apropiada de CMP se disolvió en agua ultrapura ($1,8 \pm 0,1 \mu\text{S/cm}$) para que la concentración final sea 20 g/L. Un volumen de dicha solución se mezcló con una solución de CaCl_2 (0,4 M) hasta alcanzar concentraciones finales de CaCl_2 entre 0 - 40 mM. La diferencia de conductividad entre ambas soluciones se denominó " $\Delta\kappa$ " como en Valente y col. (2011). La conductividad iónica se determinó con un conductímetro (Hanna Instruments, modelo HI2003-02, Rumania) (**Figura 28**). Este equipo se caracteriza por tener una sonda de conductividad de 4 anillos, tecnología que permite medir muestras de muy baja y muy alta conductividad. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y a temperatura ambiente. La calibración del equipo se realizó con soluciones patrones: $1413 \mu\text{S/cm}$ (Hanna Instruments, HI 70031); $5000 \mu\text{S/cm}$ (Hanna Instruments, HI 70039) y $12.880 \mu\text{S/cm}$ (Hanna Instruments, HI 70030).

2.11. Determinación del calcio por electrodo de ión selectivo

El calcio unido se determinó por el método de Berrocal y col. (1989). Se titularon 50 ml de una solución de 2 g/L de CMP (Davisco Foods International) en agua ultrapura con 200 mM de CaCl_2 . El pH se mantuvo en todo momento a 7, 8 y 9 con el agregado de NaOH de alta normalidad. Los ensayos se realizaron por triplicado junto a la curva de calibración realizada simultáneamente y a 25°C .

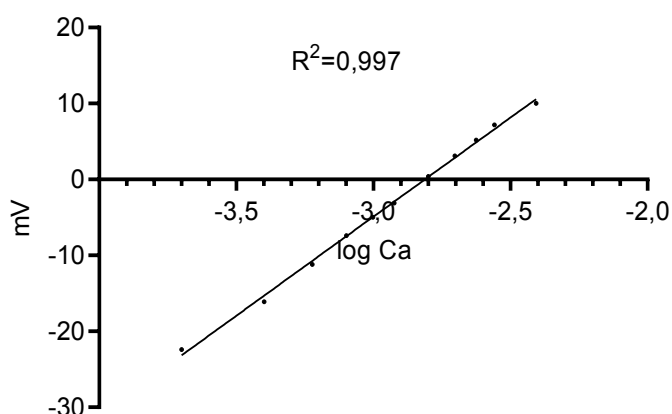


Figura 29. Curva de calibración indicando una respuesta lineal del electrodo de ión selectivo de calcio.

El calcio libre se midió con electrodo de ión selectivo modelo HI4104 conectado a un pH metro modelo HI98191 (Hanna Instruments, USA). La calibración del electrodo se realizó en forma paralela a las titulaciones en agua ultrapura con la misma condición de pH y fuerza iónica. Para el tratamiento de los datos se verificó que la respuesta del electrodo sea lineal (**Figura 29**). La medición de la diferencia de potencial se realizó después de la adición sucesiva de 50 μL de CaCl_2 20 mM a la solución. El volumen máximo agregado fue de 2 ml.

El electrodo de ión selectivo determina la actividad de calcio libre y no su concentración. Para considerar constante el efecto de la concentración de CaCl_2 en la fuerza iónica en el coeficiente de actividad del calcio (γ), se incorporó el KCl a la solución de CMP a modo de mantener constante la fuerza iónica (Haghtalab y Badizad, 2016). La siguiente Ecuación relaciona actividad con concentración:

$$c_i = \frac{a_i}{\gamma_i} \quad \text{Ecuación 14}$$

donde, c_i es la concentración de calcio libre (Ca_L); a_i es la actividad de calcio y γ_i es el coeficiente de actividad del calcio.

El calcio unido (Ca_U) se obtuvo por diferencia entre el calcio libre (Ca_L) determinado con el electrodo de calcio y el calcio total (Ca_T) determinado por espectroscopía de absorción atómica:

$$\text{Ca}_U = \text{Ca}_T - \text{Ca}_L \quad \text{Ecuación 15}$$

donde, Ca_L es el calcio libre; Ca_U es el Calcio unido al CMP y Ca_T es el calcio total.

Se consideró que un mol de CMP tiene una masa molecular promedio de 7500 Da. Los valores de pH fueron seleccionados para favorecer la unión de calcio tanto a los grupos fosfatos como carboxilatos (Mekmene, 2011).

Tratamiento de los datos experimentales

La constante de asociación aparente y el número de sitios unidos al calcio se determinaron a través de un ajuste de los datos experimentales al modelo teórico empleado por Berrocal y col. (1989).

Se graficaron los valores de la inversa de Ca_U en función de la inversa del Ca_L según la **Ecuación 16**:

$$\frac{1}{Ca_U} = \frac{1}{n_i K_{ap} Ca_L} + \frac{1}{n_i} \quad \text{Ecuación 16}$$

Los datos obtenidos fueron representados en la llamada gráfica de Klotz (Lee y col., 1977) de modo de obtener la constante de asociación aparente (K_{ap}) y el máximo calcio unido por mg de CMP (n_i).

2.12. Reversibilidad de las soluciones de CMP por pH

La cantidad apropiada de una muestra en polvo de CMP se disolvió para obtener una concentración final de 20 g/L. El pH natural de la solución fue de 6,5 y se ajustó a pH 3,5 con ácidos de alta normalidad para evitar dilución. Para ello se utilizaron: ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido acético, ácido fosfórico y ácido láctico. La solución de CMP se mantuvo en ese pH durante 1 hora bajo agitación constante. Pasado ese tiempo el pH fue ajustado nuevamente a 7,0 con NaOH (1 N). El aumento de volumen por el cambio de pH en todos los casos fue inferior al 2%.

El siguiente esquema (**Figura 30**) muestra el procedimiento de reversión del pH de las soluciones:

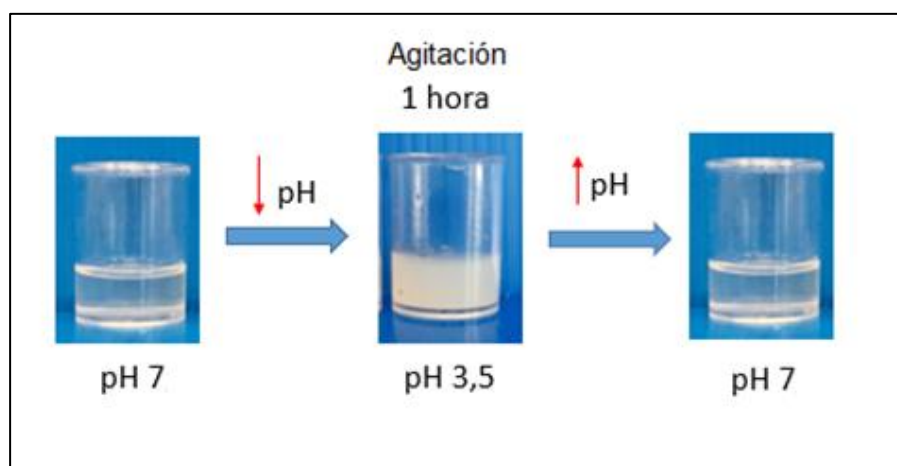


Figura 30. Esquema del procedimiento de reversión del pH.

2.13. Solubilidad de calcio en buffer fosfato en presencia de CMP

Preparación del buffer fosfato (pH 8)

Composición (para 100 ml):

Solución A: 3,7 ml de solución de dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4) 0,066 M.

Solución B: 96,3 ml de solución de hidrogenofosfato de di sodio (Na_2HPO_4) 0,066 M.

La solución buffer fosfato de sodio fue preparada en un matraz aforado de 100 ml con las cantidades mencionadas de solución A y B. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica y el agua utilizada fue ultrapura. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Preparación de la muestra

Solubilidad del CaCl_2

La capacidad de unión del catión calcio con el CMP se determinó por el método de Jung y col. (2006). El CMP en polvo se disolvió en agua ultrapura en un matraz aforado de 100 ml para lograr una concentración final de 1 g/L. La solución peptídica luego fue mezclada con CaCl_2 en exceso (5 mM) y 30 ml de buffer fosfato de sodio (20 mM). Se realizó un blanco control conteniendo sólo CaCl_2 y el buffer. Las muestras se agitaron con un agitador magnético durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C) y el pH se mantuvo en todo momento en 7,8 y fue monitoreado por un medidor de pH (Hanna Instruments, HI 98191). Luego, la mezcla se centrifugó en una centrífuga (CANVA, VT 3216, Industria Argentina) a 2000 rpm durante 40 min para precipitar las sales fosfato de calcio insolubles. El contenido del sobrenadante se filtró con filtros jeringa con membrana de Nylon® de 0,45 μm de diámetro. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. La **Figura 31** muestra un esquema de los pasos sucesivos de la preparación de la muestra.

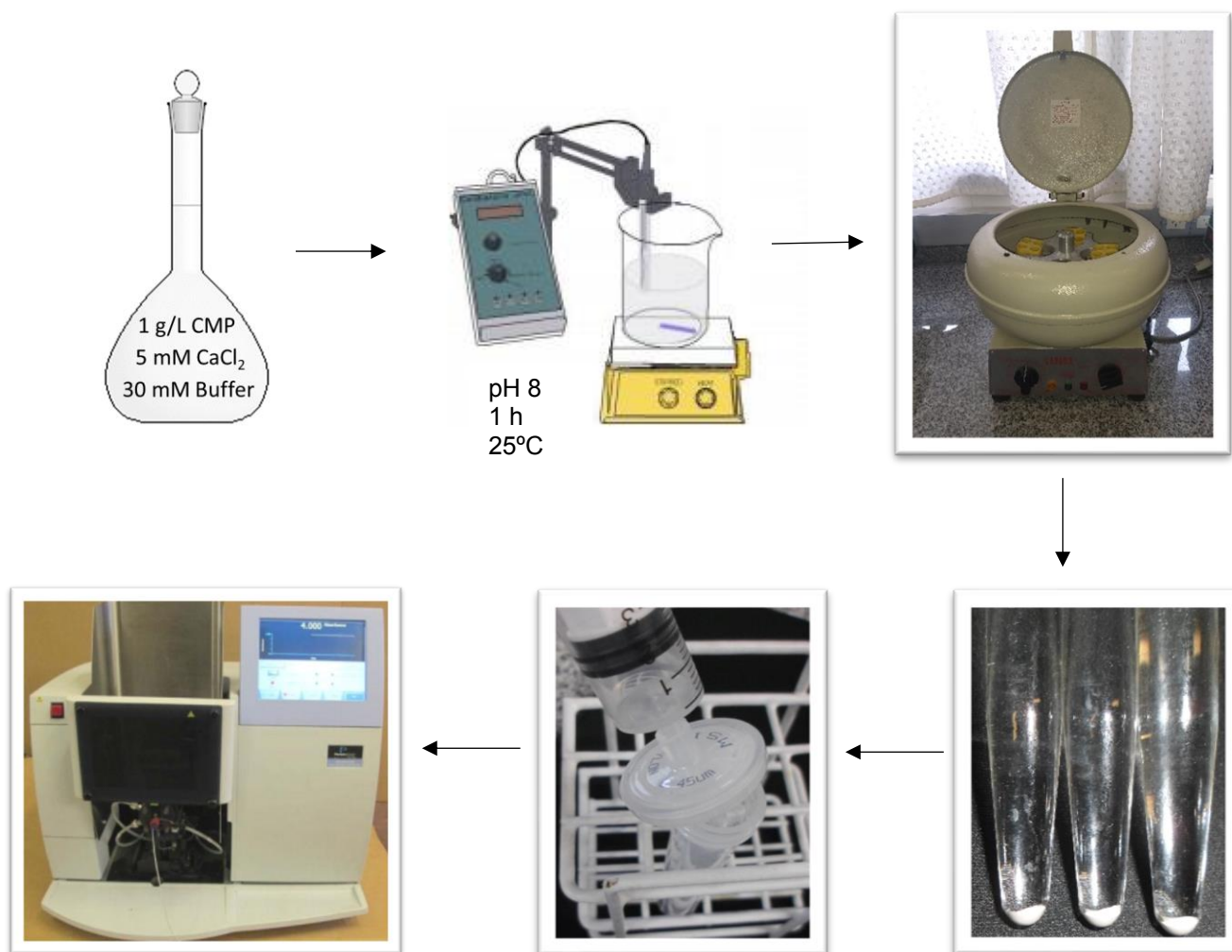


Figura 31. Esquema de la preparación de la muestra para el ensayo de solubilidad en buffer fosfato. Adaptación del método de (Jung y col., 2006).

Solubilidad del CaCO_3 en Buffer Fosfato

Para los ensayos con CaCO_3 , las concentraciones finales de las mezclas fueron 20 mM de buffer fosfato de sodio, 6 mM de CaCO_3 y $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de CMP (Chen y col., 2014; Zhao y col., 2014). Para lograr esa concentración de CaCO_3 se tomó la alícuota correspondiente de una solución sobresaturada 0,01 M de dicha sal en agua bajo agitación constante. Se procedió con la mezcla al igual que con el CaCl_2 . Los experimentos fueron realizados por cuadruplicado.

Determinación de calcio

El calcio contenido en el sobrenadante fue determinado por espectroscopía de absorción atómica con un espectrómetro (Modelo AAnalyst 200, Perkin Elmer, CA, USA). Previamente se agregó nitrato de lantano (1,5% p/v) a estándares, muestras y blancos para evitar la interferencia de fosfatos. La curva de calibración se construyó a través de soluciones estándares de calcio entre 2 y 20 ppm, graficando la absorbancia en función de la ppm de calcio.

La relación $\text{Ca}^{2+}/\text{CMP}$ se calculó con la siguiente **Ecuación 18** (Guo y col., 2015):

$$\text{Relación mmoles de } \text{Ca}^{2+}/\text{g CMP} = \frac{C}{40 * C_{\text{CMP}}} \quad \text{Ecuación 17}$$

donde, C es la diferencia entre el calcio soluble en el sobrenadante con CMP y el calcio soluble en el sobrenadante sin CMP (mg/L); C_{CMP} es la concentración de CMP (g/L) y 40 es la masa molecular del calcio (g/mol).

El contenido de calcio de la muestra de CMP (1 g/L) fue sumado al contenido total y fue 0,17 mM de Ca^{2+} .

2.14. Solubilidad de CaCl_2 en etanol en presencia de CMP

La **Figura 32** muestra un esquema del procedimiento de la técnica de determinación del calcio unido al CMP por solubilidad de CaCl_2 en etanol.

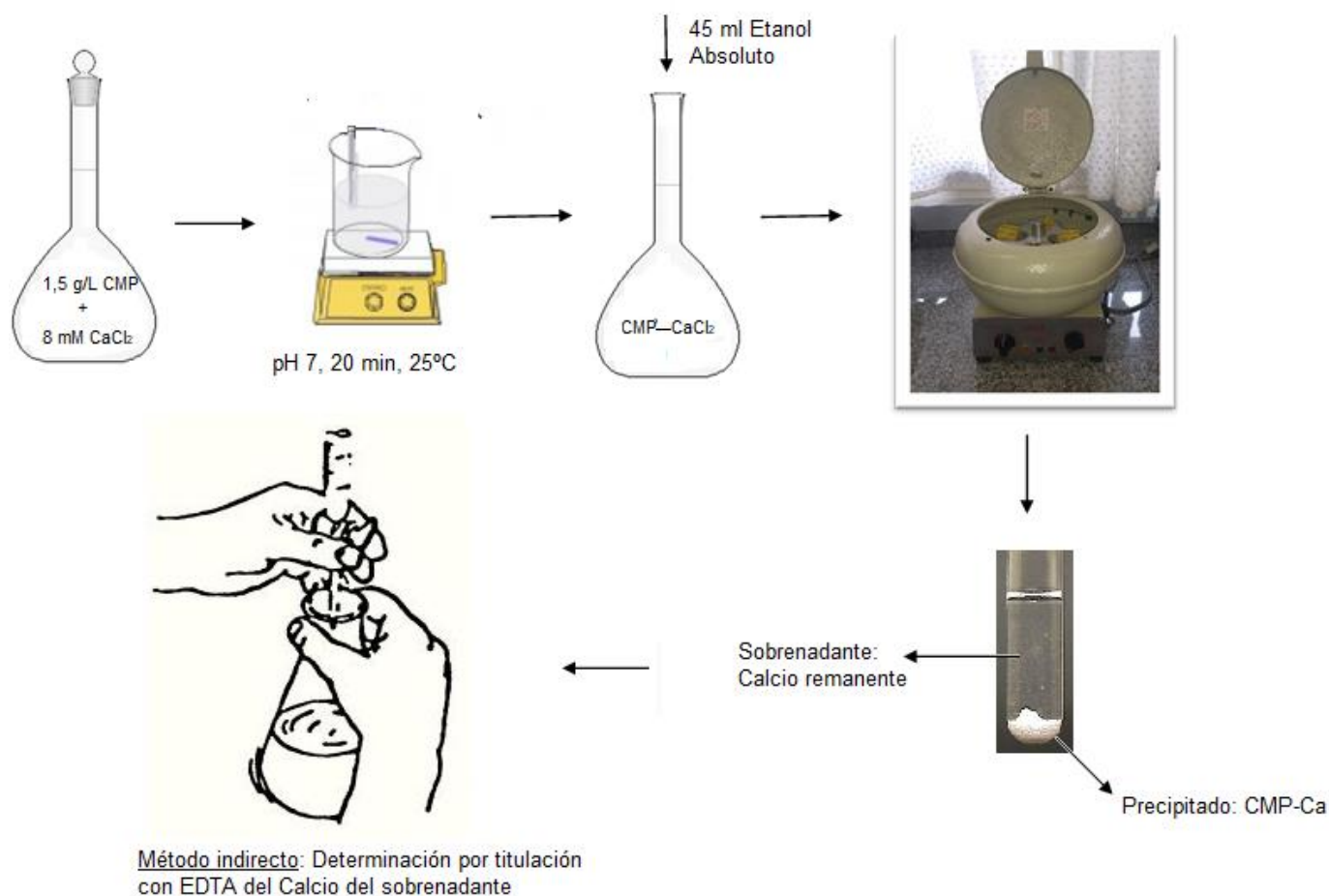


Figura 32. Esquema del ensayo de solubilidad de CaCl_2 en etanol en presencia de CMP.

El complejo Ca/CMP se preparó en un matraz de 50 ml, mezclando una solución 1,5 g/L de CMP con 1 ml de CaCl_2 0,4M (8 mM), luego se llevó a agitación constante durante 20 minutos, a 25 °C y pH 7 para dar lugar a la reacción. Todos los materiales de vidrio tuvieron un tratamiento previo con EDTA para eliminar algún posible residuo de calcio. Luego, a la mezcla se le adicionó 45 ml de etanol absoluto para remover el calcio libre y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. El analito de interés se encontró en el precipitado. Para determinar su concentración se utilizó un método indirecto determinando la concentración de calcio en el sobrenadante. Para ello, se le adicionó a este último 1 ml de solución reguladora ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, pH 10), colorante NET (negro de

eriocromo T) y se tituló con solución EDTA 0,01N. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La cantidad de calcio unido al péptido (Ca_U) se determinó por diferencia entre el calcio total agregado conocido (Ca_T) y el determinado por titulación en el sobrenadante (Ca_S):

$$Ca_U = Ca_T - Ca_S$$

Ecuación 18

El contenido de calcio de la muestra de CMP (1,5 g/L) fue sumado al contenido total y fue 0,25 mM de Ca^{2+} .

2.15. Inhibición de la precipitación de hidroxycarboxilatos de calcio (Ca_3Cit_2 y $CaLac_2$) por el CMP.

Citrato de calcio

La técnica utilizada fue una adaptación de Vavrusova y col. (2014). Se prepararon soluciones acuosas sobresaturadas combinando 2,5 g de citrato de calcio tetrahidratado con cantidades variables de CMP (0,1 y 2 g) en 100 ml de agua. El Ca^{2+} iónico incorporado por el CMP a la solución fue 0,007 y 0,014 g, cantidades que representan menos del 0,6%. El pH inicial fue de 6,5 y fue ajustado a 7,0 con HCl concentrado. Las soluciones se mantuvieron bajo agitación a temperatura constante de 10, 25 y 40 °C. Luego de dos horas, fueron centrifugadas y filtradas con filtros jeringa de Nylon 0,45 y 0,22 mm antes de cada análisis. El calcio total se determinó por titulación con EDTA (0,01 M).

Lactato de calcio

La técnica utilizada fue una adaptación de Vavrusova y col. (2014). Se prepararon soluciones acuosas sobresaturadas combinando 8 g de lactato de calcio pentahidratado con cantidades variables de CMP (0, 0,3 y 0,5 g) en 100 ml de agua. El Ca^{2+} iónico incorporado por el CMP a la solución fue 0,002 y 0,003 g, cantidades que representan menos del 0,04%. El pH estuvo entre 6,88 y 7,02. Las soluciones se mantuvieron bajo agitación a temperatura constante de 5, 10 y 20 °C (**Figura 33**). Luego de dos horas, fueron centrifugadas y filtradas con filtros jeringa de ®Nylon 0,45 y 0,22 mm antes de cada análisis. El calcio total se determinó por titulación con EDTA (0,05 M).

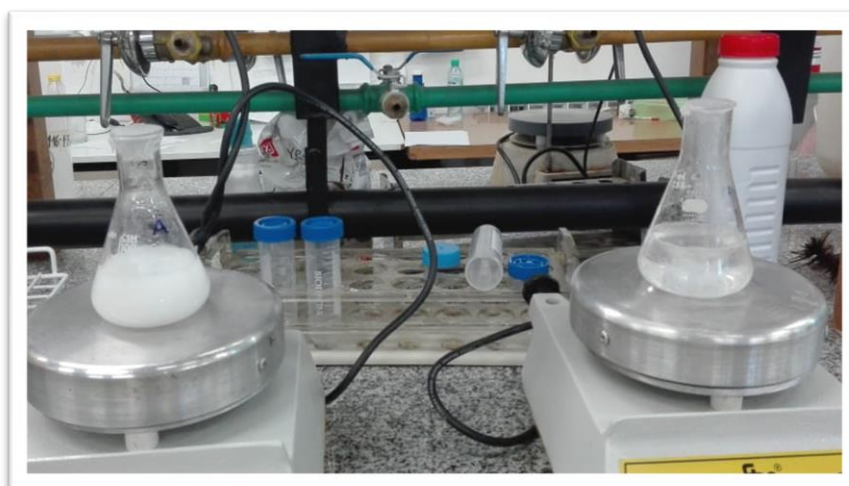


Figura 33. Ensayo de solubilidad de lactato de calcio pentahidratado en ausencia (Izq.) y presencia (Der) de CMP.

Titulación con EDTA

La técnica utilizada fue la descrita en Vavrusova y col. (2014). Se titularon 1 ml de muestra con lactato de calcio, 40 ml de agua ultrapura y 2 ml de solución de NaOH 2 N con EDTA (0,05 M). Para el citrato de calcio se titularon 3 ml de muestra con 22 ml de agua ultrapura y 4 ml de solución reguladora pH 10 con EDTA (0,01 M). Como indicador en ambos casos, se utilizó una punta de espátula de NET (Negro de eriocromo T, Biopack).

Se construyeron curvas de calibración con solución patrón de CaCl_2 0,1 M (Hanna Instruments, HI 4004-01).

Actividad de calcio

La actividad del ion calcio fue determinada con un electrodo selectivo (Hanna Instruments, USA) que mide los iones libres en solución. La calibración del electrodo se realizó usando soluciones acuosas 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2} M, preparadas con una solución patrón de CaCl_2 0,1M (Hanna Instruments, HI 4004-01). Este procedimiento se realizó cada vez que se utilizó el electrodo.

Por otro lado, la conductividad iónica se determinó con un conductímetro Edge® (Hanna Instruments, modelo HI2003-02, Rumania). Los ensayos se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente. La calibración del equipo se realizó con

soluciones patrones: 1413 $\mu\text{S/cm}$ (Hanna Instruments, HI 70031); 5000 $\mu\text{S/cm}$ (Hanna Instruments, HI 70039) y 12.880 $\mu\text{S/cm}$ (Hanna Instruments, HI 70030).

Griffin y Jurinak (1973) propusieron una relación lineal entre la conductividad (λ) y la fuerza iónica (I):

$$I \cong 0,013 \lambda \quad \text{Ecuación 19}$$

donde, I es la fuerza iónica (mol L^{-1}) y λ la conductividad medida (mS cm^{-1}).

Los valores obtenidos de I a partir de la conductividad experimental fueron usados para calcular los coeficientes de actividad según la ecuación de Davies:

$$\log \gamma^{Z^{\pm}} = -A_{DH} Z^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,30 I \right) \quad \text{Ecuación 20}$$

donde, γ es el coeficiente de actividad; $Z=+2$ para los iones Ca^{2+} y A_{DH} es la constante de Debye-Hückel. Los valores de la constante son función de la temperatura siendo 0,491; 0,498; 0,506; 0,510; 0,515 y 0,525 para 0, 10, 20, 25, 30 y 40 °C, respectivamente (Vavrusova y Skibsted, 2016).

La actividad de calcio ($a_{\text{Ca}^{2+}}$) se calculó a partir de la ecuación de Nerst que relaciona el potencial del electrodo (mV) con pCa:

$$\text{pCa} (= -\log a_{\text{Ca}^{2+}}) \quad \text{Ecuación 21}$$

Una vez calculada la concentración de cada una de las especies, la fuerza iónica se recalculó con el fin de obtener el valor verdadero. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

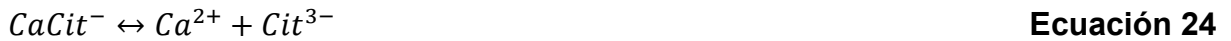
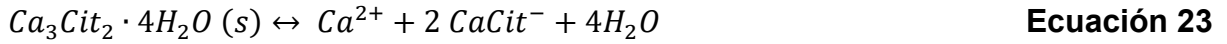
$$I = \frac{1}{2} \sum ci zi^2 \quad \text{Ecuación 22}$$

donde, ci es la concentración de cada ion y zi es la valencia del ion.

Con el nuevo valor de la fuerza iónica se obtuvieron las nuevas constantes termodinámicas y los coeficientes de actividad. Estas iteraciones fueron repetidas hasta un valor constante de fuerza iónica.

Obtención de la constante de asociación (K_{ass}) para el citrato de calcio

Para cuantificar el efecto del CMP en la sobresaturación de las sales hidroxycarboxiladas se consideró el equilibrio del calcio con su ligando, según (Vavrusova y col., 2016). Para el caso del citrato de calcio tetrahidratado, los equilibrios son los siguientes:



Donde la reacción de disociación del primer equilibrio está completamente desplazada hacia la derecha, obteniéndose Ca^{2+} y $CaCit^-$. El segundo equilibrio se disocia parcialmente. La constante termodinámica de asociación de la formación del complejo se definió como:

$$K_{ass} = \frac{a_{CaCit^-}}{a_{Ca^{2+}} a_{Cit^{3-}}} = \frac{\gamma_{CaCit^-} [CaCit^-]}{\gamma_{Cit^{3-}} [Cit^{3-}] a_{Ca^{2+}}} \quad \text{Ecuación 25}$$

Las concentraciones se obtuvieron según las siguientes relaciones:

$$[CaCit^-] = [Ca^{2+}]_{Total} - [Ca^{2+}]_{Libre} \quad \text{Ecuación 26}$$

$$[Cit^{3-}] = [Ca^{2+}]_{Libre} - \frac{[Ca^{2+}]_{Total}}{3} \quad \text{Ecuación 27}$$

La nueva fuerza iónica se verificó con la siguiente ecuación:

$$I = \frac{1}{2} (4[Ca^{2+}] + [CaCit^-] + 9 [Cit^{3-}]) \quad \text{Ecuación 28}$$

Obtención de la constante de asociación (K_{ass}) para el lactato de calcio

Para el caso del lactato de calcio pentahidratado, los equilibrios son los siguientes:



La constante termodinámica de asociación de la formación del complejo se definió como:

$$K_{ass} = \frac{a_{CaL^+}}{a_{L^-} a_{Ca^{+2}}} = \frac{\gamma_{CaL^+} [CaL^+]}{\gamma_{L^-} [L^-] a_{Ca^{+2}}} \approx \frac{[CaL^+]}{[L^-] a_{Ca^{+2}}} \quad \text{Ecuación 31}$$

Las concentraciones se obtuvieron según las siguientes relaciones:

$$[CaL^+] = [Ca^{+2}]_{Total} - [Ca^{+2}]_{Libre} \quad \text{Ecuación 32}$$

$$[L^-] = [Ca^{+2}]_{Total} + [Ca^{+2}]_{Libre} \quad \text{Ecuación 33}$$

La nueva fuerza iónica se verificó de con la siguiente ecuación:

$$I = \frac{1}{2} (4[Ca^{+2}] + [CaL^+] + [L^-]) \quad \text{Ecuación 34}$$

2.16. Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prims v7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico. Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias fueron determinadas por la prueba de Tukey para $P < 0,05$.

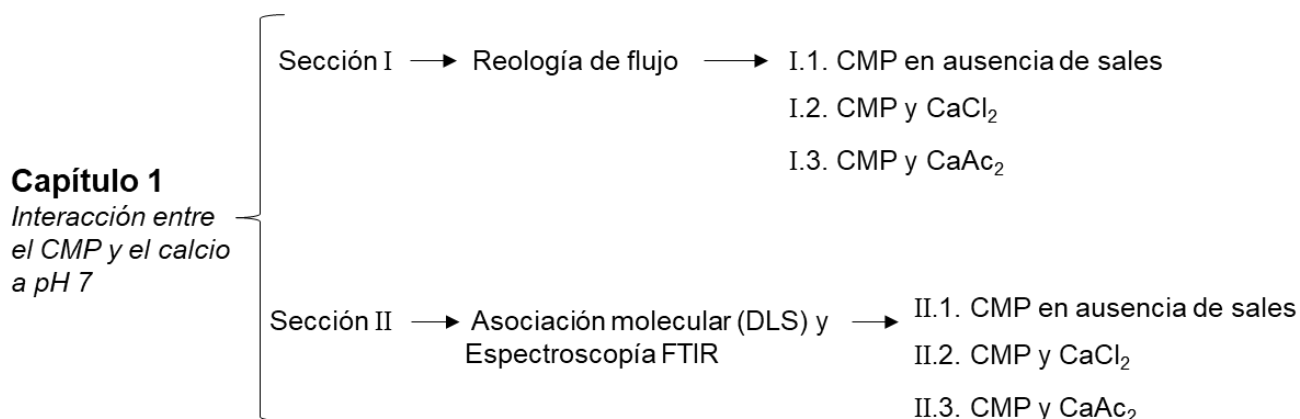
3. Referencias

- AOAC (2019). Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International, 21th ed. AOAC, USA.
- Arogundade, L. A., Eromosele, C. O., Eromosele, I. C. y Ademuyiwa, O. (2011). "Rheological properties of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa* Hochst. Ex A. Rich.) calcium proteinate and isoelectric protein isolates." *LWT - Food Science and Technology* **44**(2): 524-534.
- Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J. y Goñi, F. M. (1993). "Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **59**(1): 23-56.
- Baeza, R. (2003). Interacciones entre β -lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios, Tesis de doctorado. Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Berrocal, R., Chanton, S., Juillerat, M. A., Favillare, B., Scherz, J.-C. y Jost, R. (1989). "Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium." *Journal of Dairy Research* **56**(3): 335-341.
- Chen, D., Mu, X., Huang, H., Nie, R., Liu, Z. y Zeng, M. (2014). "Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats." *Journal of Functional Foods* **6**: 575-584.
- Dutta, A. (2017). Chapter 4 - Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*. S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah y R. K. Mishra, Elsevier: 73-93.
- Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2016). "The influence of acid type on self-assembly, rheological and textural properties of caseinomacropeptide." *International Dairy Journal* **55**: 17-25.
- Griffin, B. A. y Jurinak, J. J. (1973). "Estimation of activity coefficients from the electrical conductivity of natural aquatic systems and soil extracts." *Soil Science* **116**(1): 26-30.
- Guo, L., Harnedy, P. A., O'keeffe, M. B., Zhang, L., Li, B., Hou, H., y col. (2015). "Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides." *Food Chemistry* **173**: 536-542.
- Haghtalab, A. y Badizad, M. H. (2016). "Solubility of gypsum in aqueous NaCl + K₂SO₄ solution using calcium ion selective electrode-investigation of ionic interactions." *Fluid Phase Equilibria* **409**: 341-353.
- Haque, Z. U., y Sharma, M. (1997). "Thermal gelation of β -lactoglobulin AB purified from cheddar whey. 1. Effect of pH on association as observed by dynamic light scattering." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 2958-2963.
- Haque, Z. U., Casay, G. A., Wilson, W. W., Antila, P., & Antila, V. (1993). "Effect of casein hydrolyzates on association properties of milk proteins as seen by dynamic light scattering." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**(2): 203-207.
- Jung, W.-K., Karawita, R., Heo, S.-J., Lee, B.-J., Kim, S.-K. y Jeon, Y.-J. (2006). "Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis." *Process Biochemistry* **41**(9): 2097-2100.
- Karataş, M. y Arslan, N. (2016). "Flow behaviours of cellulose and carboxymethyl cellulose from grapefruit peel." *Food Hydrocolloids* **58**: 235-245.
- Lee, S. L., Veis, A. y Glonek, T. (1977). "Dentin phosphoprotein: an extracellular calcium-binding protein." *Biochemistry* **16**(13): 2971-2979.
- Ma, J., Lin, Y., Chen, X., Zhao, B. y Zhang, J. (2014). "Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions." *Food Hydrocolloids* **38**: 119-128.
- Malvern-Instruments "Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes." Technical note www.malvern.co.uk.
- Martinez, M. J., Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2011). "Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating." *Food Hydrocolloids* **25**(5): 860-867.

- Mekmene, O. G., Frédéric (2011). "Determination of calcium-binding constants of caseins, phosphoserine, citrate and pyrophosphate: A modelling approach using free calcium measurement." *Food Chemistry* **127**(2): 676-682.
- Mie, G. (1908). "Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions." *Annalen der Physik*. **25** (3): 377-345.
- Mohamed, M. J., J.; Ismail, M.; Othman, M. Rahman (2017). *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*. E. Inc: Pages 3-29.
- Ni, X., Chen, W., Xiao, M., Wu, K., Kuang, Y., Corke, H., y col. (2016). "Physical stability and rheological properties of konjac glucomannan-ethyl cellulose mixed emulsions." *International Journal of Biological Macromolecules* **92**: 423-430.
- Paker, I. y Matak, K. E. (2015). "Impact of sarcoplasmic proteins on texture and color of silver carp and Alaska Pollock protein gels." *LWT - Food Science and Technology* **63**(2): 985-991.
- Relkin, P., Meylheuc, T., Launay, B. y Raynal, K. (1998). "Heat-induced gelation of globular protein mixtures. A DSC and scanning electron microscopic study." *Journal of Thermal Analysis* **51**: 747-755.
- Roig, M. J., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. y Lagarda, M. J. (1999). "Calcium bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas-comparison between dialysis and solubility methods." *Food Chemistry* **65**: 353-357.
- Skoog, D. L., J ; Holler, F (1998). 5° ed. *Principios de análisis instrumental*. E. McGraw-Hill: 409-461.
- Stading, M. y Hermansson, A.-M. (1990). "Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures." *Food Hydrocolloids* **4**(2): 121-135.
- Stepanek, P. (1993). *Data analysis in light scattering. Dynamic light scattering. The methods and some applications*. W. Brown. London, U.K., Clarendon Press.: 177-241.
- Surewicz, W. K., Mantsch, H. H. y Chapman, D. (1993). "Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment." *Biochemistry* **32**(2): 389-394.
- Valente, A. J. M., Ribeiro, A. C. F., Rita, M. B. B. J., Carvalho, R. A., Estes, M. A. y Lobo, V. M. M. (2011). "Transport properties of aqueous solutions of calcium lactate in the absence and presence of β -cyclodextrin." *Journal of Molecular Liquids* **161**(3): 125-131.
- Vavrusova, M., Liang, R. y Skibsted, L. H. (2014). "Thermodynamics of Dissolution of Calcium Hydroxycarboxylates in Water." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(24): 5675-5681.
- Vavrusova, M. y Skibsted, L. H. (2016). "Aqueous solubility of calcium citrate and interconversion between the tetrahydrate and the hexahydrate as a balance between endothermic dissolution and exothermic complex formation." *International Dairy Journal* **57**: 20-28.
- Wang, X., Gao, A., Chen, Y., Zhang, X., Li, S. y Chen, Y. (2017). "Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization." *Food Chemistry* **229**: 487-494.
- Willard, H. H. M., Lynne L., Jr.; Dean, John A (1981). *Instrumental Methods of Analysis* Wadsworth Publishing Company: Belmont C.A.
- Zhao, L., Huang, S., Cai, X., Hong, J. y Wang, S. (2014). "A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate." *Journal of Functional Foods* **10**: 46-53.
- Zhu, K., Kanu, P., Claver, I., Zhu, K. y Qian, H. (2009). "A method for evaluating Hunter whiteness of mixed powders." *Advanced Powder Technology - Advanced powder technology* **20**: 123-126.

RESULTADOS

Los resultados de este primer capítulo se dividirán en dos Secciones, la primera estudiará la interacción entre el CMP y el calcio a nivel macroscópico a través del estudio del comportamiento de flujo del CMP y las sales de calcio CaCl_2 o CaAc_2 . La segunda Sección estudiará la interacción a nivel molecular entre el CMP y el calcio, a través del estudio de su asociación molecular por Dispersión Dinámica de luz (DLS) y por espectroscopía IR por transformada de Fourier (FTIR).



Se describen aquí algunos conceptos que ayudarán a la lectura de esta tesis:

Asociación: es una organización a nivel molecular a través de uniones débiles entre sitios específicos, por ejemplo, la formación de monómeros, dímeros, etc.

Autoensamblaje (o “self assembly”): es una asociación espontánea y reversible de moléculas por medio de interacciones no covalentes (puente hidrógeno, hidrofóbicas, van der Waals, electrostáticas) que las organiza en estructuras ordenadas a múltiples escalas (Lacou y col., 2016). Se caracteriza por la difusión espontánea y la asociación específica de las moléculas dirigida por interacciones no covalentes (Rajagopal y Schneider, 2004). Algunos ejemplos son la formación de micelas, de cristales de lípidos y de monocapas.

CAPITULO 1

Interacción CMP/calcio a pH neutro

Sección I

Nivel Macroscópico

¿Por qué es importante estudiar las interacciones de los sistemas CMP/calcio a través de la reología de flujo?

El conocimiento de las propiedades reológicas es esencial para el desarrollo, control de la calidad, la evaluación sensorial de los productos alimenticios y para el diseño de los equipos de proceso. Además, las mediciones reológicas proporcionan una información fundamental respecto a la organización estructural de los alimentos (Ahmed y Ramaswamy, 2003). Esta Sección está motivada en el estudio de la interacción entre el CMP y el calcio para su potencial uso en bebidas a base de CMP cuyo pH sea superior a 4,5, condición en la cual el autoensamblaje del péptido no es posible y por lo tanto se mantendría en solución. El autoensamblaje del CMP juega un rol importante en la formación de los agregados visibles que se observan en bebidas ácidas de aislados de proteínas de suero de queso (WPI) durante el almacenamiento (Villumsen y col., 2015). El control de la viscosidad de una bebida a base de CMP permitiría mantener la estabilidad durante su vida útil.

Objetivo:

El objetivo de esta Sección I fue caracterizar la interacción entre el CMP y el calcio a nivel macroscópico a través del estudio del comportamiento de flujo del CMP en presencia de CaCl_2 o CaAc_2 y la influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento con el objeto de definir criterios generales aplicables al diseño de bebidas innovadoras con CMP y calcio.

I.1. Caracterización del comportamiento de flujo del CMP a pH neutro

A fin de estudiar el comportamiento de flujo del CMP y las sales de calcio antes mencionadas, se caracterizó en primer lugar el comportamiento de flujo del CMP solo (en ausencia de sales) en relación a las variables de interés: concentración, pH y temperatura.

Las condiciones elegidas fueron las siguientes:

- 1.1. El CMP fue evaluado en un rango de concentración variable (de 1 a 15% p/p) a pH 7 y 25 °C.
- 1.2. Luego, el comportamiento de flujo del CMP fue estudiado a pH 5, 6, 8 y 9 (valores del entorno del pH neutro). La concentración elegida para el CMP fue de 15 % p/p obtenida a partir del estudio anterior.
- 1.3. Finalmente, se analizó la influencia de la temperatura en el rango 5 - 60 °C para soluciones de CMP al 15 % p/p a pH 5, 6, 8 y 9.

I.1.1. Efecto de la concentración

La **Figura 1.1 A** muestra las curvas de comportamiento de flujo de soluciones de CMP a distintas concentraciones (1, 3, 5, 8, 10, 12 y 15 % p/p) a pH 7 y 25 °C, realizadas con la técnica descrita en la **Sección 2.2, de Materiales y Métodos**. Los datos experimentales se ajustaron con el modelo de Herschel-Bulkley (**Ecuación 5, Materiales y Métodos**) con buenos ajustes del coeficiente de determinación ($R^2 > 0,998$). Se hallaron los valores de K (coeficiente de consistencia) y n (índice de comportamiento de flujo). Los resultados mostraron que los índices K aumentaron con la concentración de las soluciones desde 0,001 a 0,010 Pa.sⁿ, esta tendencia fue más notoria por encima de 8 % p/p (**Figura 1.1 B**). El esfuerzo de corte inicial, τ_0 , fue prácticamente despreciable para concentraciones entre 1 y 12 % p/p y fue 0,11 Pa para la concentración de 15 % p/p (datos no mostrados). El índice de comportamiento de flujo, n , mostró que las soluciones de CMP exhibieron un comportamiento prácticamente newtoniano ($n \approx 1$) para todas las concentraciones (**Figura 1.1 C**), como se ha visto para soluciones de moléculas de bajo peso molecular (Kale y col., 2015). Sin embargo, se observó una ligera tendencia al comportamiento pseudoplástico (con valores de n cercanos a 0,95) para las soluciones al 15 % p/p (**Figura 1.1 C**).

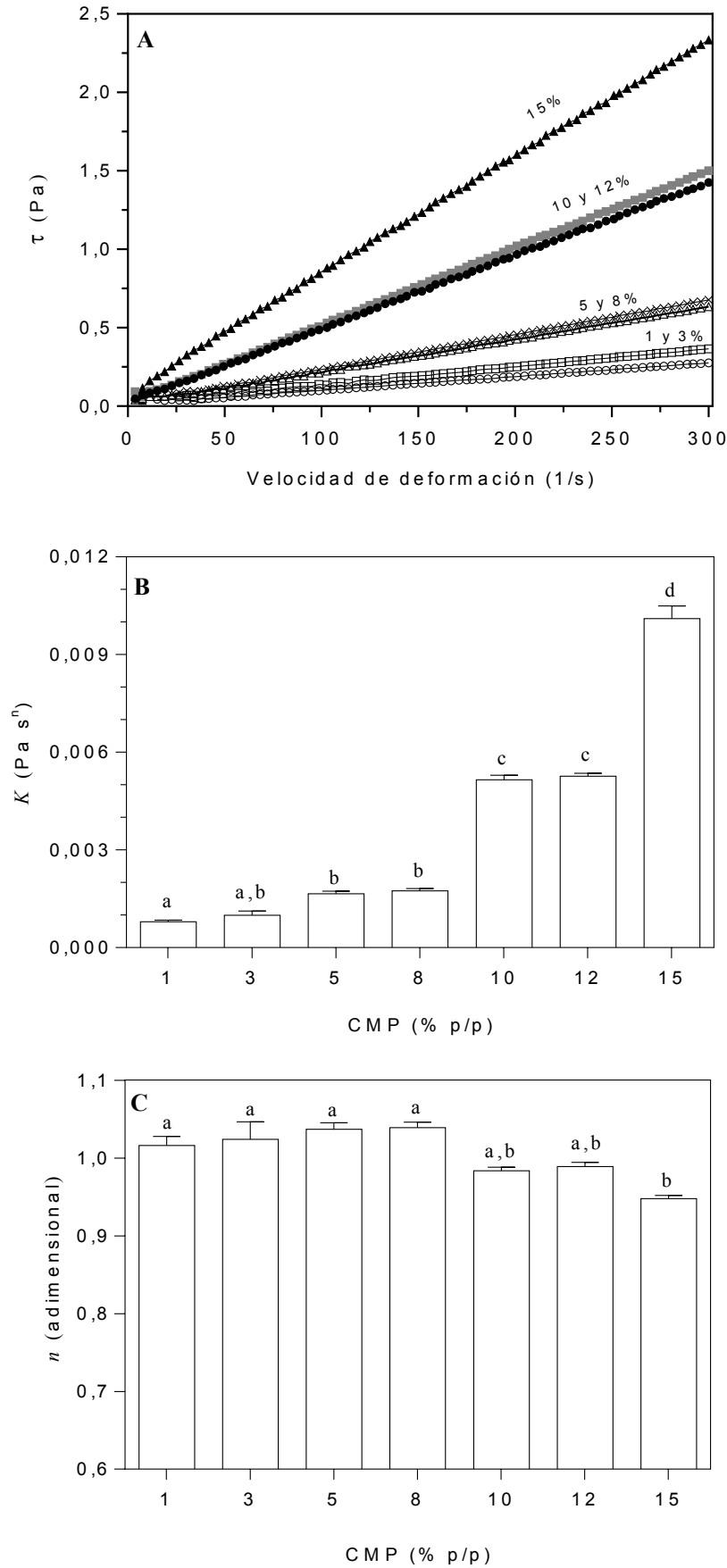


Figura 1.1. A) Curvas de comportamiento de flujo de soluciones de CMP a pH 7,0 y 25 °C. Concentraciones de CMP: 1 (○); 3 (□); 5 (△); 8 (×); 10 (●); 12 (■) y 15% p/p (▲). Parámetros ajustados al modelo de Herschel-Bulkley: **B)** K y **C)** n . Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ($n = 3$). Las barras representan desvío estándar.

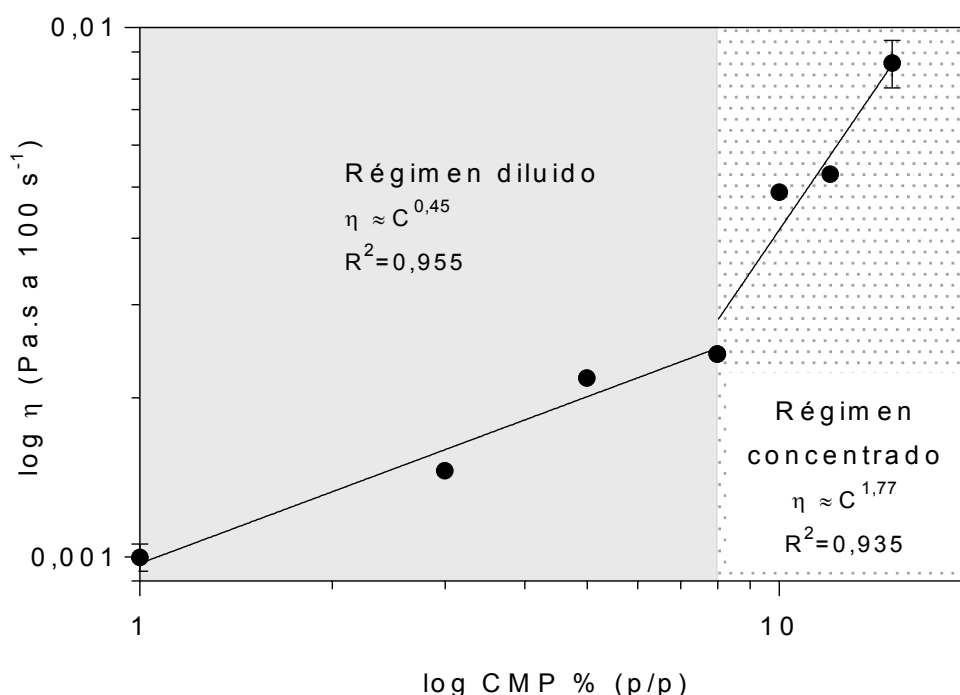


Figura 1.2. Dependencia de la viscosidad aparente a 100 s^{-1} (η_{100}) con la concentración de CMP. Se indican las líneas de ajuste y su R^2 .

Las propiedades de flujo del CMP pueden compararse con las de las caseínas, que presentan una conformación secundaria poco organizada (Walstra, 1984). Pitkowski y col. (2009) estudiaron el comportamiento de flujo de soluciones de caseinato de sodio (CasNa) y encontraron un comportamiento newtoniano a concentraciones por debajo de 14 % p/p y un comportamiento pseudoplástico a concentraciones superiores.

Se halló una buena correlación al comparar los resultados obtenidos con los estudios de flujo del CMP realizados previamente por otros autores (Ahmed y col., 2003), quienes trabajaron con CMP de la misma procedencia (Davisco Food International®) a una concentración de 12,5 % p/p, a pH 7 y 20 °C y también ajustaron sus resultados con el modelo de Herschel Bulkley. Ellos encontraron un τ_0 de 0,0109 Pa, una K de 0,0027 Pa.s^n y un n de 0,966, todos estos valores estuvieron en el orden de los obtenidos en esta tesis. Por otro lado, los datos de otros autores (Burgardt y col., 2014) fueron totalmente diferentes. Ellos informaron un comportamiento dilatante, con un valor de n entre 1,15 y 1,32, a pH 6,5,

independientemente de la concentración de CMP, a pesar de proceder del mismo proveedor (Davisco Food International®). La discrepancia entre los resultados puede deberse a la utilización de otro rango de velocidad de deformación (entre 0 y 85 s⁻¹), al equipo utilizado (Reómetro Brookfield DV III ultra, MA, USA) y a un modelo matemático diferente (ley de la Potencia). En contraste, los valores de índice de consistencia que hallaron fueron similares $K \approx 0,015 \text{ Pa.s}^n$.

Para las proteínas en general y también para el CMP, la viscosidad aumenta con la concentración. La **Figura 1.2** muestra el gráfico doble logaritmo de la viscosidad aparente a 100 s⁻¹ (η_{100}) vs la concentración de CMP. En dicha figura pueden diferenciarse dos regímenes: diluido y concentrado. La intersección de estos regímenes lineales se denomina concentración de solapamiento, C^* (Kale y col., 2015), y se caracteriza por un cambio abrupto en la pendiente de la curva (De Kruif y col., 2015). El valor de C^* encontrado para las soluciones de CMP fue del 8 % p/p. Debajo de C^* , las moléculas de CMP se comportarían como "partículas" individuales en solución. En soluciones diluidas, cada molécula está aleatoriamente separada y las interacciones intermoleculares pueden despreciarse (Huang y col., 2016).

Se acepta que la viscosidad depende de la concentración con la relación $\eta_{100} \approx C^b$, donde C es la concentración de proteína (% p/p), y b es un coeficiente característico que describe la velocidad de cambio de la viscosidad con la concentración (Zhang y col., 2016). Para las soluciones de CMP, por encima de C^* , la viscosidad aumentó más rápidamente ($b = 1,77$) que por debajo de C^* ($b = 0,45$). El valor mayor de b en el régimen concentrado puede explicarse por un mayor solapamiento e interpenetración de las moléculas. Zhang y col. (2016) realizaron un estudio similar utilizando un concentrado de proteína de suero de leche (WPC) y hallaron un valor de C^* de 12 % (p/p), siendo los valores de $b = 0,38$ (para el régimen diluido) y $b = 1,37$ (para el régimen concentrado), correlacionándose con los datos obtenidos para el CMP a pesar de ser diferentes materiales.

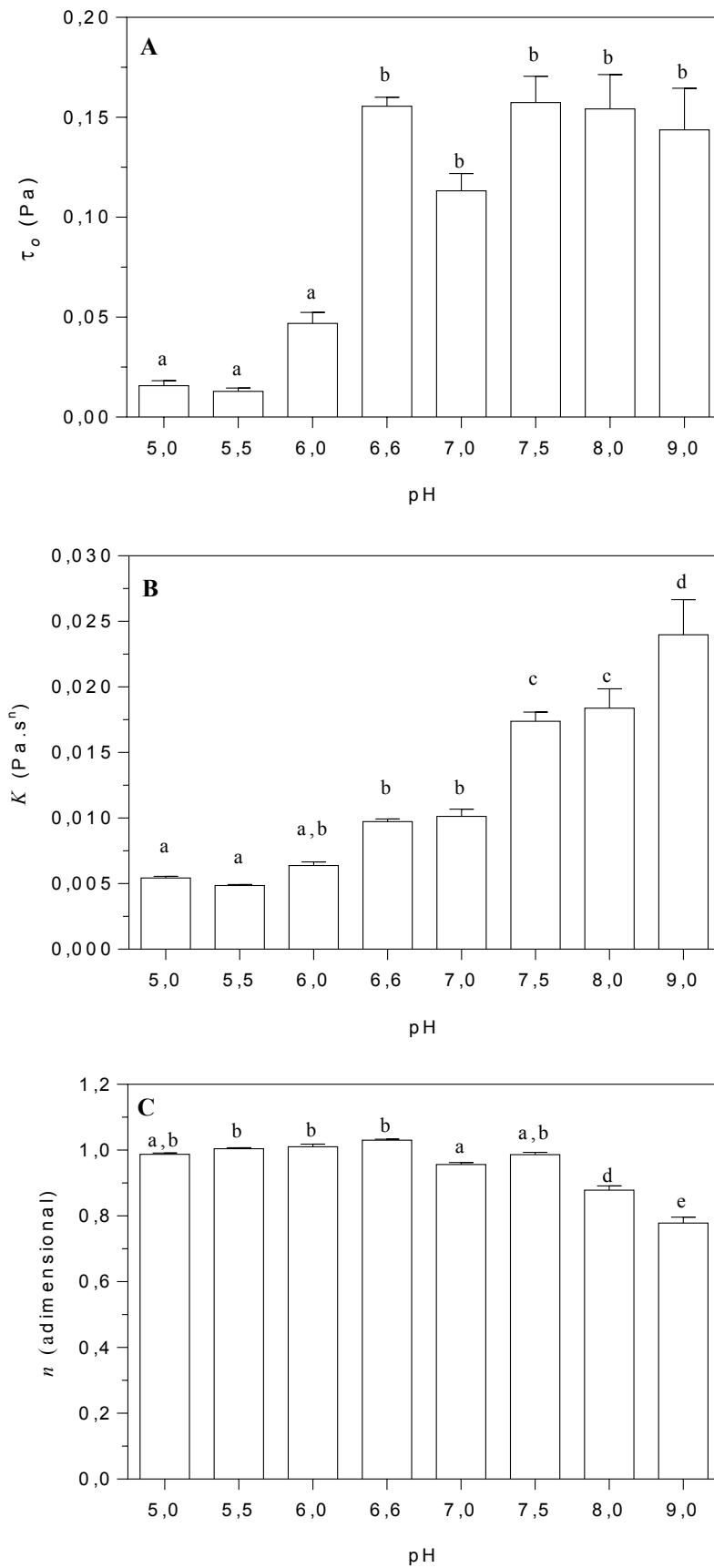


Figura 1.3. Parámetros τ_0 (A), K (B) y n (C) ajustados con el modelo de Herschel – Bulkley a diferentes valores de pH para soluciones de CMP 15% (p/p) a 25 °C. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ($n = 3$). Las barras representan el desvío estándar.

I.1.2. Efecto del entorno de pH (entre 5,0 y 9,0)

La dependencia del comportamiento de flujo con el pH se estudió en soluciones de CMP al 15 % p/p y a valores de pH entre 5,0 y 9,0, condiciones en las cuales el CMP no se autoensambla en el tiempo (Farías y col., 2010). Se puede observar en la **Figura 1.3 A** que los valores de τ_0 fueron insignificantes a pH 5,0 y 6,0 ($\approx 0,02$ Pa), sin embargo, para los otros valores de pH fueron 10 veces más altos ($\approx 0,15$ Pa). Así mismo, cuando el pH aumentó desde 6,6 a 9,0 también se incrementaron los valores de K (**Figura 1.3 B**) y no hubo diferencias significativas entre el pH 5,0 y 6,0 ($p > 0,05$).

El índice n (**Figura 1.3 C**), reveló un comportamiento de flujo newtoniano a pH entre 5,5 a 6,6 y un claro comportamiento pseudoplástico entre pH 7,0 y 9,0. Una posible explicación a estas diferencias de comportamiento, estaría dada por la hidratación molecular, al aumentar el pH los grupos carboxílicos se ionizan más fuertemente incrementando la hidratación de los péptidos (Li y col., 2017). Las moléculas altamente hidratadas pueden perder agua progresivamente al incrementar la velocidad de deformación, causando así la reducción de la viscosidad aparente (Arogundade y col., 2011), reflejado en la disminución del índice n . Esto explicaría el carácter pseudoplástico de las soluciones a pH 7,0 – 9,0.

I.1.3. Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura en las propiedades de flujo se analizó para soluciones de CMP a la concentración de 15 % p/p a diferentes temperaturas entre 5 y 60 °C (**Figura 1.4**). El incremento de la temperatura produjo una disminución significativa en la viscosidad para el rango de pH estudiado (5,0 - 8,0), lo que indicó que las soluciones acuosas de CMP fluyeron más fácilmente. La disminución de η puede atribuirse al debilitamiento de las interacciones moleculares en solución (Ma y col., 2014; Karataş y Arslan, 2016). Este efecto se debe al incremento de la energía cinética de las moléculas que disminuye la interacción entre solvente y soluto (Arogundade y col., 2011).

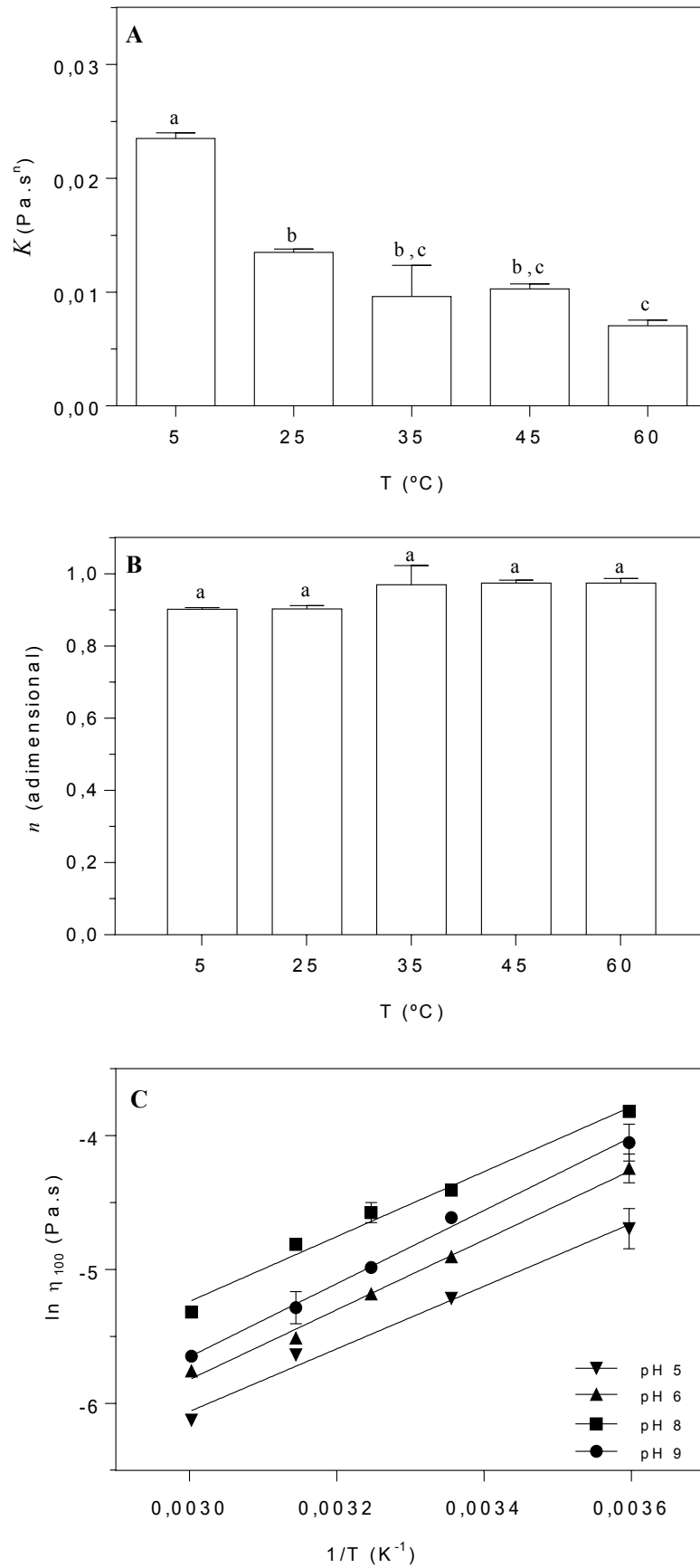


Figura 1.4. Evolución de K (A) y n (B) con la temperatura y dependencia de la viscosidad aparente a 100 s⁻¹ con la inversa de la temperatura (C) para soluciones de CMP al 15 % p/p a diferentes valores de pH: 5 (▼); 6 (▲); 8 (■) y 9 (●). Las barras representan al desvío estándar.

Los enlaces de hidrógeno, las interacciones electrostáticas y de van der Waals son de naturaleza exotérmica y se desestabilizan a altas temperaturas, mientras que las interacciones hidrofóbicas son endotérmicas y se estabilizan a altas temperaturas aunque no indefinidamente (Arogundade y col., 2011). Es importante señalar que las soluciones de CMP a pH > 4,5 no mostraron ningún cambio en la distribución de tamaños de partícula al someterse al calentamiento según lo reportado por Martínez y col. (2011). Este comportamiento distingue al CMP de las otras proteínas del lactosuero, las cuales se desnaturalizan a altas temperaturas con el consecuente aumento de la viscosidad (Gómez-Arellano, 2017). Si bien el índice K disminuyó con la temperatura (**Figura 1.4 A**), no hubo cambios significativos en los valores de n (**Figura 1.4 B**). La ecuación de Arrhenius (**Ecuación 6, Materiales y Métodos**) describe el efecto de la temperatura en la viscosidad aparente de las soluciones de CMP a una velocidad de deformación específica (100 s^{-1}), η_{100} . La viscosidad aparente disminuyó exponencialmente con la temperatura en todos los pH estudiados (**Figura 1.4 C**). El valor de viscosidad más alto para esa velocidad de deformación correspondió al pH 8, seguido por el pH 9, pH 6 y, por último, el pH 5. La energía de activación de flujo, E_a , refleja la sensibilidad de la viscosidad frente a los cambios de temperatura (Karataş y col., 2016). Los valores de E_a y R^2 obtenidos se muestran en la **Tabla 1.1**. La E_a fue independiente del pH y con un valor de aproximadamente 20 kJ/mol. La magnitud de la E_a fue superior a aquella informada para soluciones de CMP al 12,5 % a pH 7 ($E_a = 12,4 \text{ kJ/mol}$) por Ahmed y col. (2003), quienes utilizaron CMP del mismo proveedor. Esta discrepancia podría deberse al rango diferente de temperatura utilizado (20 - 80 °C).

Tabla 1.1. Energía de activación (E_a) y R^2 para soluciones de CMP al 15 % (p/p) obtenidos a la viscosidad aparente a 100 s^{-1} .

	pH 5	pH 6	pH 8	pH 9
E_a (kJ/mol)	$19,4 \pm 1,5^a$	$21,6 \pm 1,0^a$	$20,1 \pm 1,5^a$	$22,7 \pm 0,9^a$
R^2	0,988	0,994	0,984	0,996

Los datos son medias \pm desviaciones estándar ($n = 2$ o 3). Diferentes supra índices indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 1.2. Energía de activación (E_a) y R^2 para soluciones de CMP al 5 y 15 % (p/p) a pH 7 obtenidas a la viscosidad aparente a 100 s⁻¹.

	5%	15%
E_a (kJ/mol)	20,4 ± 0,9 ^a	18,6 ± 2,3 ^a
R^2	0,998	0,955

Los datos son medias ± desviaciones estándar. Diferentes supra índices indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, los valores de E_a también fueron independientes de la concentración (5 y 15% p/p) como se muestra en la **Tabla 1.2**. Los resultados indicaron que las soluciones acuosas de CMP fueron sensibles a los cambios de temperatura independientemente de la concentración. Barreto y col. (2003) informaron una E_a para el caseinato de sodio (13 % p/p) de 12,1 kJ/mol que aumentó con la concentración de la suspensión. En comparación, las soluciones de CMP tuvieron mayores cambios en la viscosidad con el aumento de la temperatura que las suspensiones de caseinato de sodio.

I.1.4. Conclusiones parciales

El CMP tiene un comportamiento de flujo newtoniano que pasa a pseudoplástico al aumentar la concentración (>12 % p/p) o el pH (7,0 – 9,0). El ligero comportamiento pseudoplástico a pH 7,0 –9,0 podría explicarse por las interacciones entre el CMP y el agua.

La concentración de solapamiento de los regímenes diluido y concentrado fue 8 % (p/p). La E_a de flujo es baja y cercana a 20 kJ/mol, y fue independiente de la concentración y del pH.

I.2. Caracterización del comportamiento de flujo del CMP en presencia de CaCl_2 a pH neutro

La presencia de los iones influyen fuertemente en las propiedades de flujo de las suspensiones de proteínas (Thomar y col., 2014) y pueden ser un parámetro importante para controlar sus propiedades de ensamblado y la viscosidad (Loveday y col., 2010; Wang y col., 2018). Las sales están presentes en las formulaciones de bebidas proteicas con diferentes propósitos (agentes saborizantes, preservadores de coagulación, estabilizantes buffer y fortificación mineral). El diseño de bebidas con alta concentración de proteínas y calcio es un gran desafío, especialmente durante el almacenamiento y las fluctuaciones de temperatura (Westerik y col., 2015).

El interés en analizar el comportamiento de flujo del CMP en presencia de CaCl_2 se debe principalmente a caracterizar su interacción con el calcio iónico. La proteína parental del CMP, la κ -caseína es insensible a los iones calcio a pH neutro (Huppertz y col., 2018). Además, se conoce que el ácido siálico, abundante en el CMP, forma complejos (1:1) con el calcio a pH neutro (Jaques y col., 1977).

Por todo lo expuesto, el objetivo de esta Sección fue estudiar el efecto de la presencia de CaCl_2 (sal comúnmente utilizada en las formulaciones de alimentos) sobre el comportamiento de flujo de soluciones diluidas y concentradas de CMP a pH neutro y sobre el pH de las soluciones. Además, se exploró el efecto de la temperatura y del tiempo de almacenamiento.

I.2.1. Efecto de la adición de CaCl_2 sobre el comportamiento de flujo del CMP

Tal como fue dicho anteriormente en la **Sección 1.1**, la dependencia de la viscosidad con la concentración de CMP mostró dos regímenes diferentes (diluido y concentrado) siendo 8 % (p/p) la concentración de solapamiento. La **Figura 1.5** muestra los parámetros K y n , ajustados al modelo de Herschel-Bulkley ($R^2 > 0,998$) para las soluciones de CMP en régimen diluido (5 % p/p) con una concentración variable de CaCl_2 . En régimen diluido, las muestras libres de sal exhibieron un comportamiento newtoniano, con un valor de esfuerzo de corte despreciable ($\tau_0 < 0,006 \text{ Pa}$) y no fue afectado por la presencia de CaCl_2 (datos no mostrados).

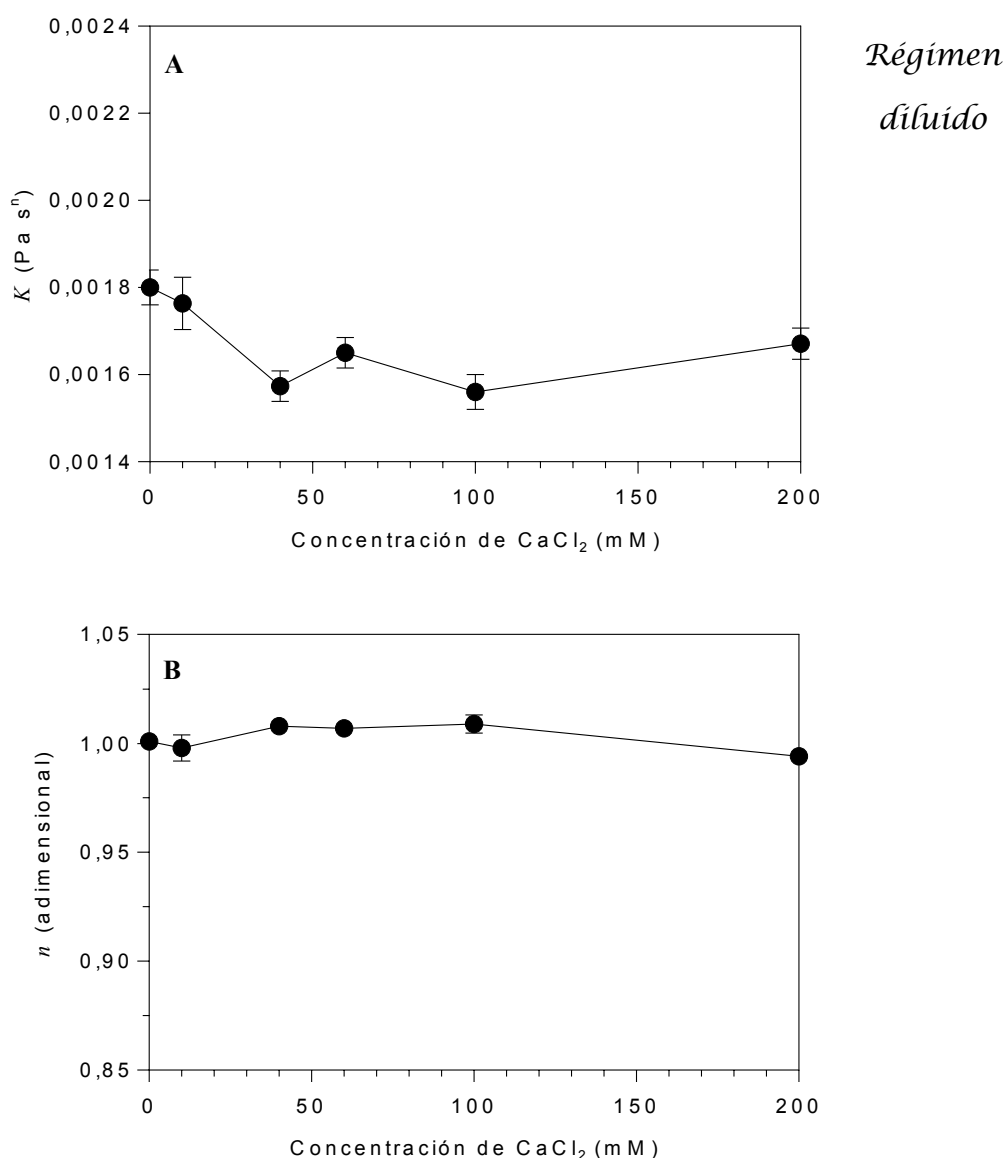


Figura 1.5. Efecto de la adición de CaCl_2 (●) en soluciones de CMP al 5 % p/p sobre los parámetros ajustados al modelo de Herschel-Bulkley: K (A) y n (B) a 25 °C y pH 7,0.

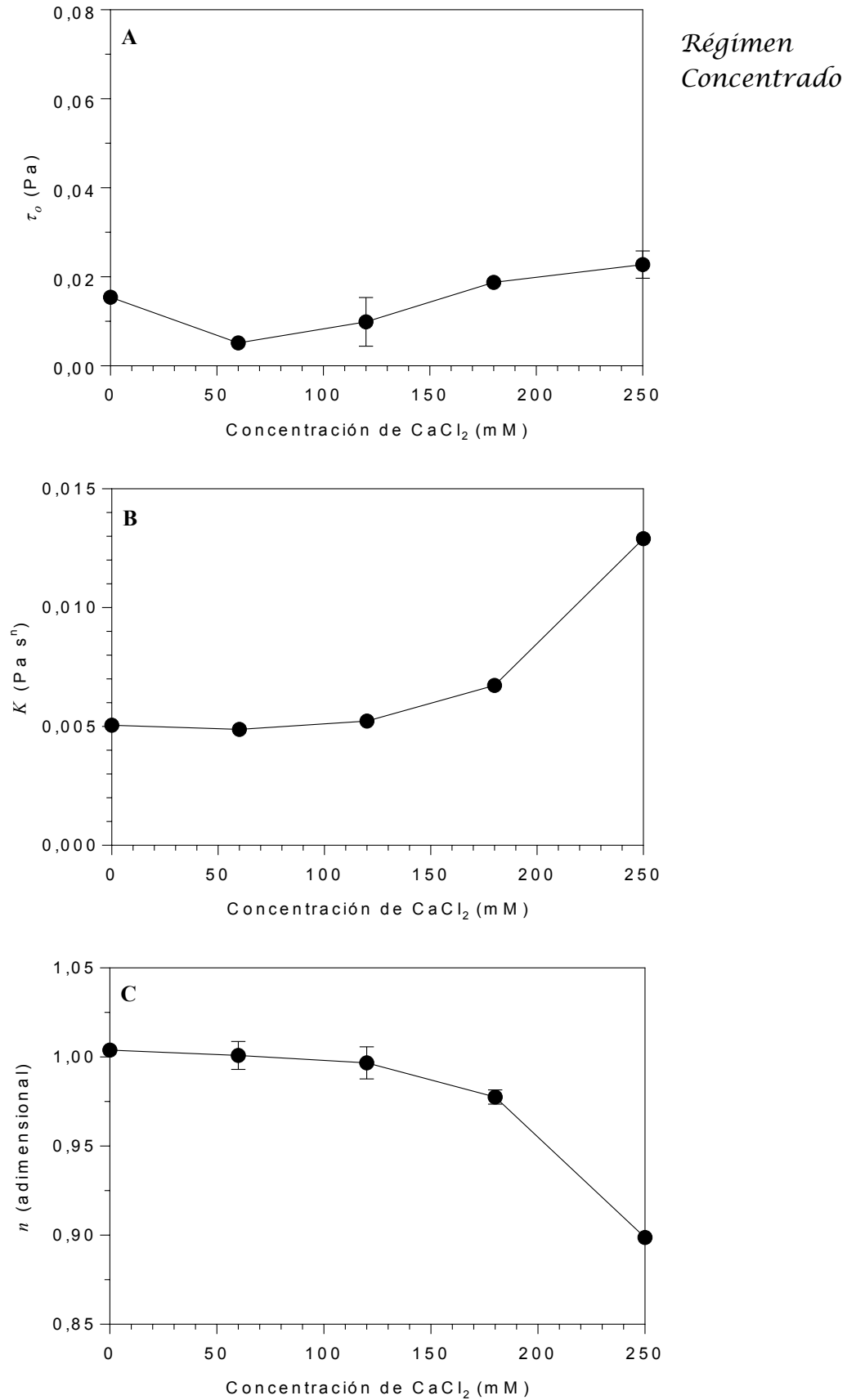


Figura 1.6. Efecto de la adición de cloruro de calcio (●) a soluciones de CMP al 12% p/p sobre los parámetros ajustados al modelo de Herschel-Bulkley: τ_0 (A), K (B) y n (C), a 25 °C y pH 7,0.

En cuanto al índice K , en el régimen diluido, se observó que disminuyó con la adición de cloruro de calcio a la solución de CMP y fue independiente de la concentración de sal agregada (**Figura 1.5 A**). El índice n no se vio modificado y fue, en todos los casos, cercano a 1, indicando soluciones newtonianas.

En el régimen concentrado, el valor de τ_0 no se vio afectado al adicionar CaCl_2 (**Figura 1.6 A**). La incorporación de calcio a la solución de CMP aumentó fuertemente el índice K por encima de 120 mM (**Figura 1.6 B**) y de forma opuesta, el índice n bajó (**Figura 1.6 C**).

A modo de comparación, las propiedades reológicas de las soluciones de CMP se pueden confrontar con suspensiones de caseinato de sodio al 14 % p/p, que también fueron afectadas por la presencia de CaCl_2 (Pitkowski y col., 2008; Thomar y col., 2014). Estos autores describieron que una pequeña cantidad de CaCl_2 aumentó la viscosidad, pero una mayor proporción causó la insolubilidad y la precipitación de una fracción de las caseínas disminuyendo así la viscosidad.

Los cationes como el calcio pueden interactuar con los grupos carboxílicos $[\text{R}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}^-]$ de los residuos aspártico (Asp) y glutámico (Glu) (abundantes en la cadena de CMP), y el carboxilo C-terminal y los carbonilos $[\text{R}-(\text{C}=\text{O})-\text{R}']$ de la cadena peptídica (Loveday y col., 2010), residuos glicosilados y las serinas fosforiladas. Cuando se agrega sal a una solución diluida de CMP, se espera una disminución en la viscosidad debido a que las cadenas peptídicas individuales asumen una configuración general más pequeña y al tener espacio entre ellas, a menudo no están lo suficientemente cerca para interactuar. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración del péptido (régimen concentrado), la presencia de CaCl_2 permite la formación de puentes entre las diferentes formas asociadas de CMP. Es sabido que el calcio divalente con carga positiva actúa como puente entre las proteínas con carga negativa (Westerik y col., 2015).

I.2.2. Efecto de la adición de CaCl_2 sobre el pH de las soluciones de CMP

En la **Figura 1.7** se muestra cómo la adición de CaCl_2 a las soluciones de CMP al 5% (p/p) disminuyó el pH desde 6,4 (en ausencia de sales) a 5,6 (en presencia de 200 mM de CaCl_2). La disminución del pH se debería a la liberación de protones por la interacción entre el calcio iónico (Ca^{2+}) y el CMP como se ha reportado previamente para otros sistemas, como por ejemplo, en leche (Lin, 2018) y soluciones de caseinato de sodio (Pitkowski y col., 2009). Para este último caso, el pH disminuyó desde 6,7 (en ausencia de sales) hasta 6,0 (en presencia de 100 mM de Ca^{2+}) independientemente de la concentración total de caseinato (Pitkowski y col., 2009). Es importante señalar que el CaCl_2 se encuentra totalmente ionizado a pH neutro, es decir, el par CaCl^+ es indetectable como fue señalado por Muñoz Noval y col. (2018) y por consiguiente el Ca^{2+} iónico es la única especie que puede interactuar con el CMP.

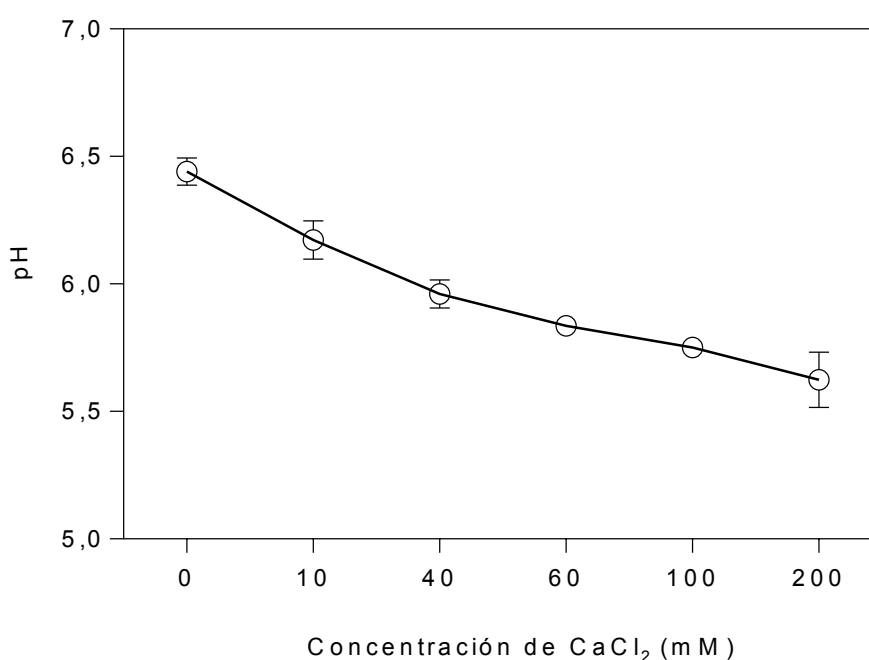


Figura 1.7. Efecto de la incorporación de CaCl_2 (O) sobre el pH de las soluciones de CMP (5 %). El pH fue medido inmediatamente después de la adición de las soluciones salinas (25 °C).

I.2.3. Efecto de la temperatura sobre el comportamiento de flujo de soluciones de CMP y CaCl₂

La viscosidad de las soluciones de CMP con CaCl₂ disminuyó con el incremento de la temperatura, como lo observado para las soluciones libres de sal (**Sección 1.3**). El efecto de la temperatura en la viscosidad aparente, η_{100} , de soluciones de CMP diluidas (5 % p/p) a la velocidad de deformación de 100 s⁻¹ se modeló por la ecuación de Arrhenius (**Ecuación 6, Materiales y Métodos**) y se determinó la energía de activación que representa la sensibilidad de la viscosidad aparente con la temperatura (Karataş y col., 2016). De acuerdo con la **Tabla 1.3**, la presencia de CaCl₂ (40 o 100 mM) en soluciones de CMP no tuvieron un efecto significativo en la *Ea*. El valor hallado fue de aproximadamente 20 kJ/mol, similar a lo expuesto en las **Tablas 1.1 y 1.2**, que muestran que fue independiente de la concentración y del pH.

Tabla 1.3. Energía de activación (*Ea*) y R² para soluciones de CMP al 5 % p/p y distintas concentraciones de CaCl₂ obtenida a la viscosidad aparente de 100 s⁻¹ en un rango de 5 a 60 °C y a pH 7,0.

	Libre de sal	40 mM CaCl ₂	100 mM CaCl ₂
<i>Ea</i> (kJ/mol)	20,4 ± 0,9 ^a	21,1 ± 0,7 ^a	20,3 ± 0,1 ^a
R ²	0,998	0,999	0,999

Los datos son medias ± desviaciones estándar. Diferentes letras supra índices indican diferencias significativas (p <0,05).

I.2.4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las soluciones de CMP y CaCl_2 .

Para evaluar con detalle el efecto del tiempo sobre las soluciones CMP/ CaCl_2 al 5% p/p, éstas se almacenaron durante 7 días a 25 °C y se determinaron las propiedades de flujo (**Figura 1.8**). Se observó que, a los 7 días, la viscosidad η_{100} aumentó a partir de 100 mM de CaCl_2 , indicando el progreso de la interacción entre el calcio iónico y el CMP.

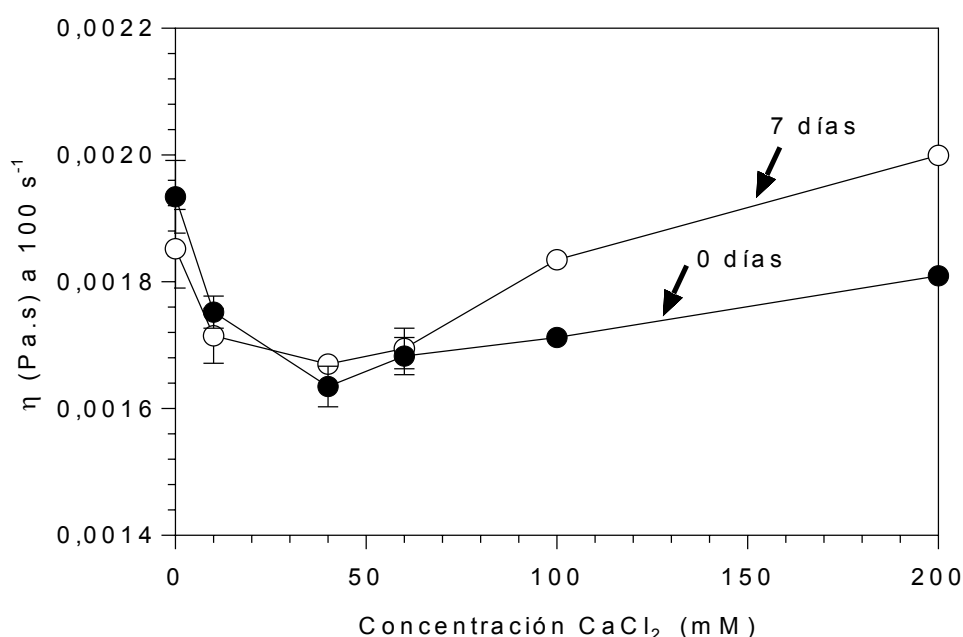


Figura 1.8. Viscosidad aparente a 100 s⁻¹ de soluciones de CMP 5 % p/p y concentraciones crecientes de cloruro de calcio a 0 (●) y 7 (○) días de almacenamiento. Temperatura 25 °C.

Adicionalmente, se utilizó la técnica colorimétrica que permitió analizar el cambio de la coloración de las soluciones con el tiempo. Inicialmente, las soluciones de 12% p/p de CMP solo fueron transparentes a pH 7,0, mientras que las muestras con CaCl_2 fueron turbias (**Figura 1.9**).

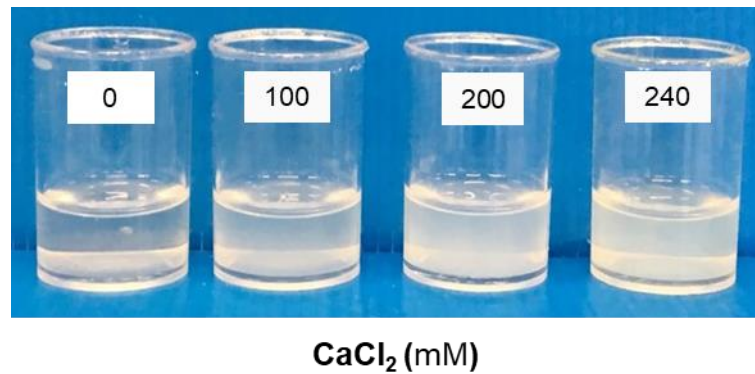


Figura 1.9. Apariencia de soluciones de CMP al 12 % p/p con cantidades crecientes de cloruro de calcio inmediatamente de ajustar el pH a 7 y 25°C.

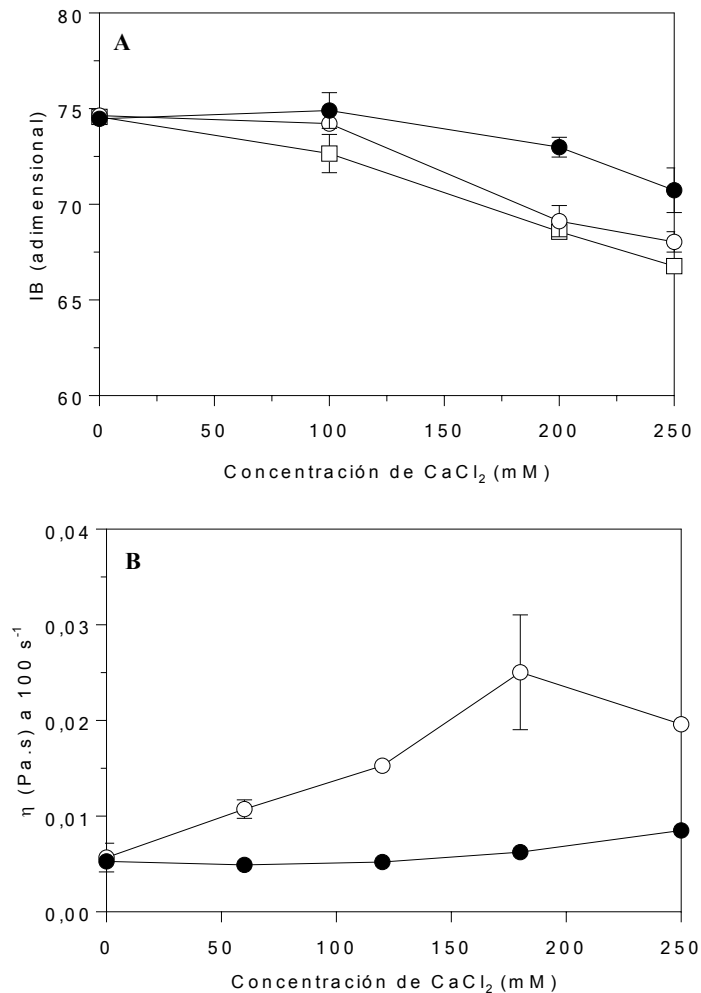


Figura 1.10. A) Índice de blanco (IB) de soluciones de CMP al 12 % p/p con cantidades crecientes de CaCl₂ inmediatamente después de ajustar el pH a 7,0 (●); bajo almacenamiento de: 7 días (○) y de 14 días (□). **B)** Efecto del tiempo de almacenamiento al tiempo 0 (●) y 7 (○) días en la viscosidad aparente a 100 s⁻¹ de soluciones de CMP 12 % con cantidades crecientes de CaCl₂. Los datos son media ± desvío estándar (Temperatura 25 °C).

La evolución del índice de blanco, IB, se usó como indicador del autoensamblaje del CMP durante el almacenamiento para las soluciones concentradas (**Figura 1.10**). Para las muestras con más de 100 mM de CaCl_2 , el IB disminuyó con el tiempo de almacenamiento (**Figura 1.10 A**). La disminución del IB es un indicador de la turbidez y está relacionado con la mayor dispersión de la luz por la formación de estructuras de mayor tamaño en la solución. La **Figura 1.10 B** representa la viscosidad aparente a 100 s^{-1} de soluciones de CMP 12 % p/p en función de la concentración de CaCl_2 y muestra un incremento de este parámetro durante el almacenamiento (7 días).

I.3. Caracterización del comportamiento de flujo del CMP en presencia de CaAc₂ a pH neutro

El acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{-CO}_2)_2$ o CaAc_2) es una de las sales más prescritas en EE.UU para el tratamiento de la hiperfosfatemia en pacientes sometidos a diálisis por su función como quelante de fosfatos (Qunibi y col., 2004; Cho y col., 2018). La Asociación Española de Pediatría recomienda una dosis media de entre 2 y 2,6 g de CaAc_2 por cada comida como quelante de fosfatos en adultos (AEP, 2015). Por lo expuesto en la Sección I.2, donde se demostró que el CMP tolera grandes cantidades de CaCl_2 sin precipitar, es interesante estudiar el efecto de otra sal de calcio, que podría facilitar la ingesta de la enorme cantidad de CaAc_2 que debe ingerir un paciente con hiperfosfatemia usando al CMP en la formulación de medicamentos. Además, el CaAc_2 es un aditivo alimentario que se usa como estabilizante de la acidez y su solubilidad en agua a 20 °C es de 400 g/L.

El objetivo de esta Sección fue analizar el efecto de la presencia de CaAc_2 sobre el comportamiento de flujo de soluciones diluidas y concentradas de CMP a pH neutro y sobre el pH de las soluciones. Además, se exploró el efecto de la temperatura y del tiempo de almacenamiento al igual que lo realizado para las soluciones de CMP y CaCl_2 .

I.3.1. Efecto de la adición de CaAc_2 sobre el comportamiento de flujo del CMP

La **Figura 1.11** muestra los parámetros τ_0 , K y n , ajustados al modelo de Herschel-Bulkley ($R^2 > 0,998$) para las soluciones de CMP diluidas (5 % p/p) y la **Figura 1.12** para las soluciones concentradas (12 % p/p) con concentraciones variables de CaAc_2 . En el régimen diluido, (**Figura 1.11 A**), el valor de τ_0 fue despreciable ($\tau_0 \approx 0,004$ Pa) y no fue afectado por la presencia de CaAc_2 . En la **Figura 1.11 B** se puede observar que el índice K se incrementó ligeramente desde 0,0018 a 0,0022 Pa.s^n con 200 mM de CaAc_2 . Los **Figura 1.11 C** indicó que las soluciones de CMP con CaAc_2 fueron newtonianas.

Para el régimen concentrado, el τ_0 creció significativamente desde 0,02 a 0,25 Pa con la adición de 60 mM o superior de CaAc_2 (**Figura 1.12 A**). El índice K también aumentó a partir de esa concentración desde 0,005 hasta 0,03 en 200 mM de CaAc_2 y las soluciones se volvieron levemente pseudoplasticas ($n \cong 0,95$) (**Figura 1.12 B y C**).

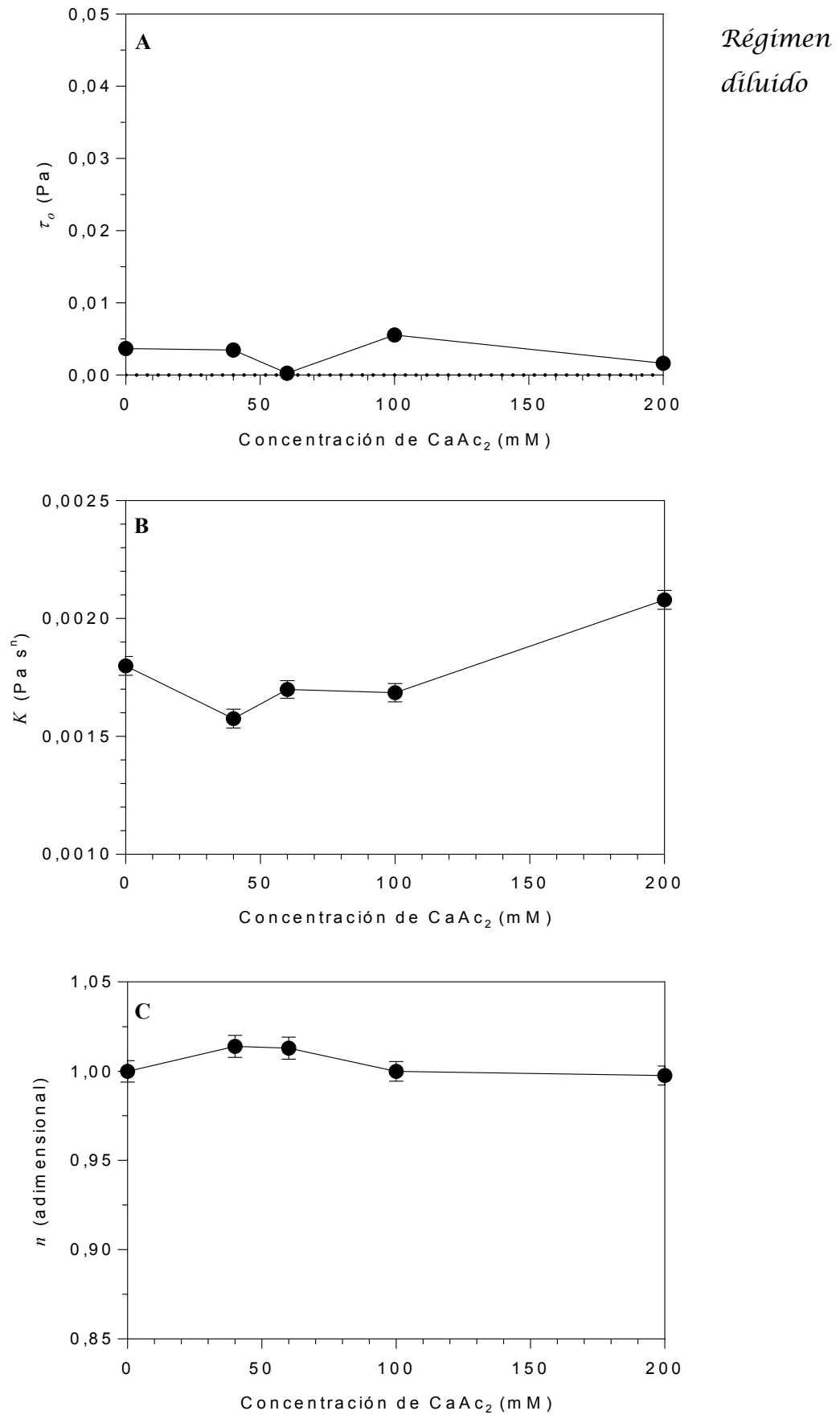


Figura 1.11. Efecto de la adición de CaAc_2 (●) a soluciones de CMP al 5 % p/p (régimen diluido) sobre los parámetros ajustados al modelo de Herschel-Bulkley: τ_0 (A), K (B) y n (C). Temperatura 25 °C y pH 7,0.

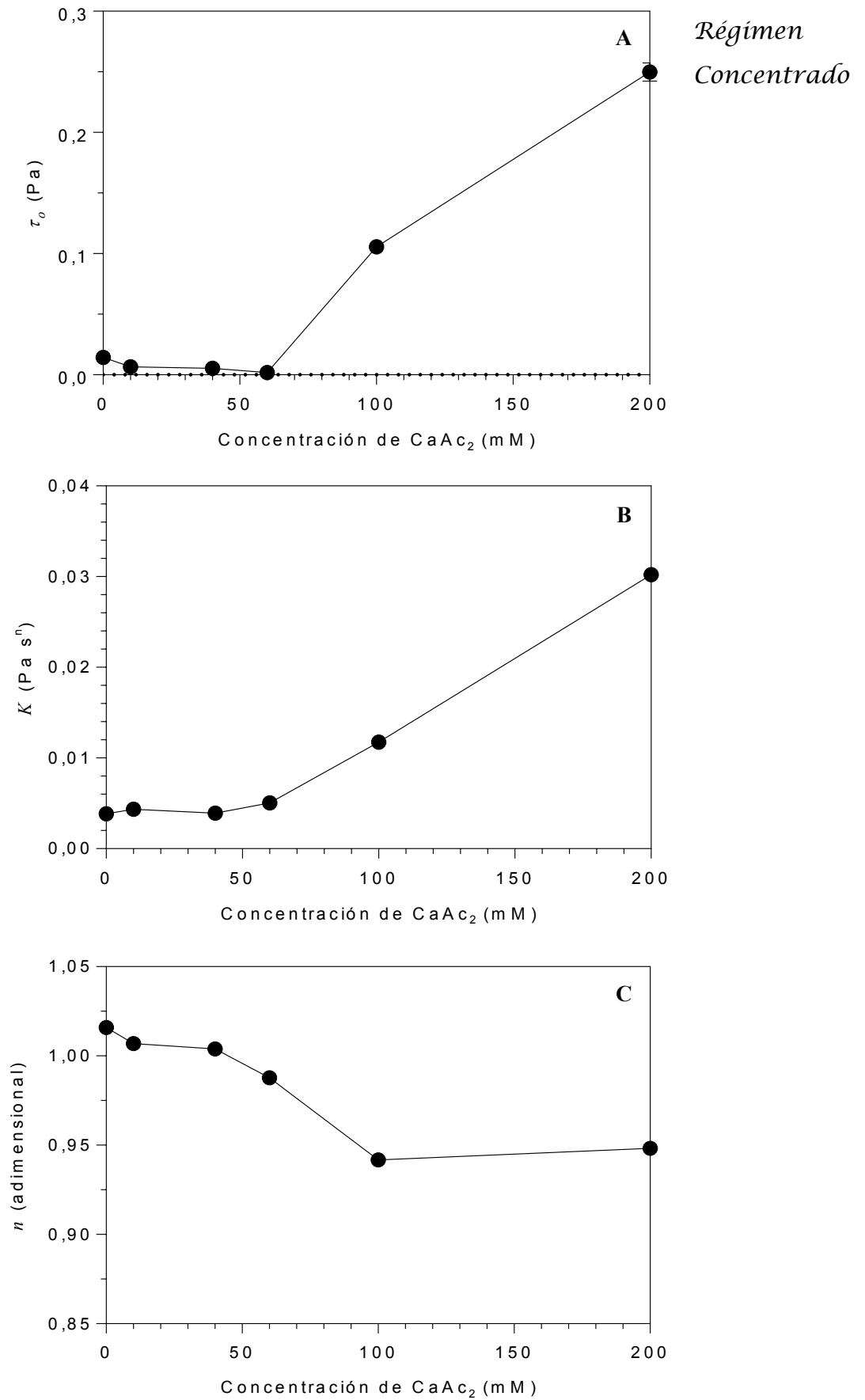


Figura 1.12. Efecto de la adición de CaAc_2 (●) a soluciones de CMP al 12 % p/p (régimen concentrado) sobre los parámetros ajustados al modelo de Herschel-Bulkley: τ_0 (A), K (B) y n (C). Temperatura 25 °C y pH 7,0.

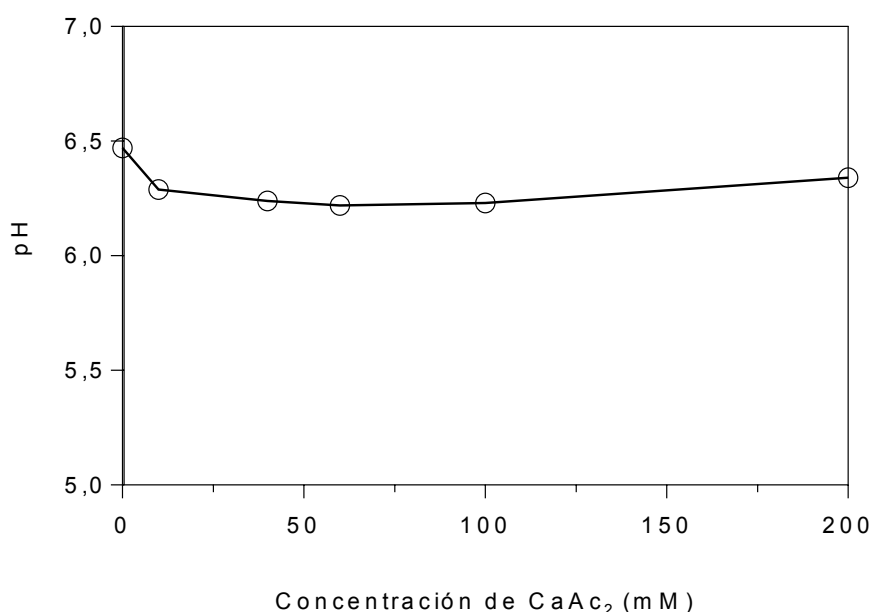


Figura 1.13. Efecto de la incorporación de CaAc₂ (O) sobre el pH de las soluciones de CMP (5%) inicialmente a pH 6,5. El pH fue medido inmediatamente después de la adición de las soluciones salinas. La temperatura fue 25 °C.

I.3.2. Efecto de la adición de CaAc₂ sobre el pH de las soluciones de CMP

En la **Figura 1.13** se muestra cómo la adición de CaAc₂ afectó sólo ligeramente al pH de las soluciones de CMP al 5 %, disminuyendo desde 6,4 (en ausencia de sal) a 6,2-6,3 con un mínimo en 60 mM de CaAc₂. El efecto de disminución de pH fue notablemente menor que al usar CaCl₂ (**Figura 1.7**).

Dos reacciones ocurren en la ionización del CaAc₂ o de cualquier hidroxicarboxilato de calcio (Vavrusova y col., 2014). La primera de ellas, es una disociación completa (**Ecuación 35**) y la segunda un equilibrio (**Ecuación 36**):



Según las ecuaciones presentadas arriba, el CMP a pH neutro, de carga neta negativa, puede interaccionar con dos especies posibles (CaAc^+ y Ca^{2+}). Los resultados mostraron que, la liberación de H^+ por la interacción entre el CMP y estas especies fue mucho menor al encontrado al usar CaCl_2 (**Figura 1.7**).

I.3.3. Efecto de la temperatura sobre el comportamiento de flujo de soluciones de CMP y CaAc_2 .

La energía de activación (E_a) estimada por la ecuación de Arrhenius para soluciones de CMP 5 % (p/p) y concentraciones variables de CaAc_2 (desde 10 a 200 mM) a pH 7,0 se muestra en la **Tabla 1.4**. Su valor también fue aprox. 20 kJ/mol, como los obtenidos anteriormente para las soluciones de CMP solo o en presencia de CaCl_2 .

Tabla 1.4. Energía de activación (E_a) para soluciones de CMP al 5 % (p/p) y distintas concentraciones de CaAc_2 obtenidas a viscosidad aparente de 100 s^{-1} a 25°C y pH 7,0.

	Libre de sal	10 mM	40 mM	60 mM	100 mM	200 mM
E_a (kJ/mol) CaAc_2	$20,4 \pm 0,9^a$	$20,9 \pm 0,7^a$	$20,4 \pm 1,0^a$	$18,9 \pm 1,0^a$	$20,2 \pm 0,4^a$	$18,2 \pm 0,8^a$

Los datos son medias \pm desviaciones estándar. Diferentes letras supra índices indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

I.3.4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las soluciones de CMP y CaCl_2 .

La **Figura 1.14** muestra la apariencia de las soluciones de CMP al 12% p/p con cantidades crecientes de CaAc_2 a pH 7. Como puede observarse, las soluciones gelificaron en el corto plazo de 17 horas, por ello no pudo determinarse su viscosidad en el almacenamiento. La **Figura 1.15** muestra la disminución del IB de dichas soluciones que se enturbiaron al gelificar en ese corto plazo.

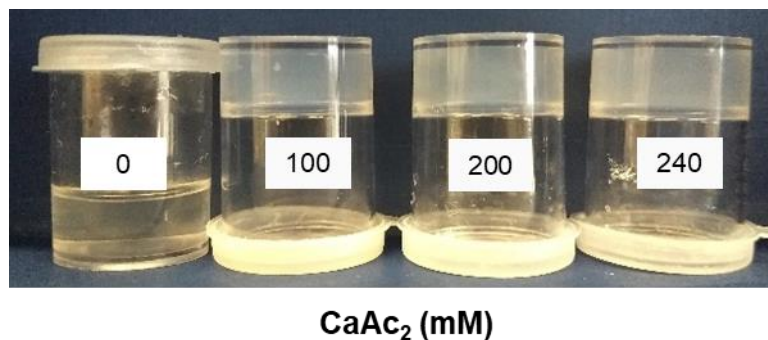


Figura 1.14. Apariencia de las soluciones de CMP 12 % (p/p) con cantidades crecientes de CaAc₂ a pH 7 luego de 17 horas de almacenamiento.

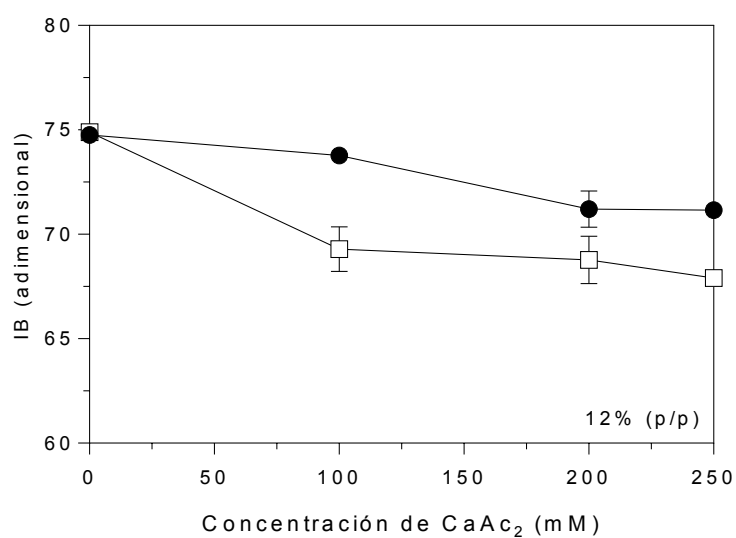


Figura 1.15. Índice de blanco (IB) de soluciones de CMP 12 % (p/p) con cantidades crecientes de CaAc₂ inmediatamente después de ajustar el pH a 7 (●); y a las 17 hs (□).

I.4. Discusión y Conclusión de la Sección I

Según los resultados de reología de flujo, el CMP en ausencia de sales tiene un comportamiento de flujo newtoniano que pasa a pseudoplástico al aumentar la concentración (>12 % p/p) o el pH (8 - 9) y su E_a de flujo es baja, independiente de la concentración y cercana a 20 kJ/mol, lo cual indica que un incremento en la temperatura produce una disminución significativa de la viscosidad de las soluciones acuosas de CMP. La dependencia de la viscosidad con la concentración es diferente según se trabaje en un régimen diluido o concentrado, definidos por una concentración de solapamiento de 8 % p/p.

La adición de CaCl_2 a las soluciones de CMP al 5% (p/p) provocó la disminución del pH que podría deberse a la liberación de protones por la interacción entre el calcio iónico (Ca^{2+}) y el CMP. Por otro lado, el pH de las soluciones de CMP con CaAc_2 no disminuyó en la misma medida que con CaCl_2 , sugiriendo que son dos las posibles especies que interaccionan con las moléculas: Ca^{2+} y CaAc^+ . Es importante destacar que las soluciones de cloruro y acetato de calcio con la misma concentración tienen la misma fuerza iónica.

En cuanto a la reología de flujo, las soluciones de CMP en presencia de CaCl_2 o CaAc_2 tuvieron un comportamiento similar en régimen diluido. En cambio, en régimen concentrado, la viscosidad fue entre 2 y 3 veces superior con CaAc_2 que con CaCl_2 . Además, las soluciones concentradas de CMP en presencia de CaAc_2 terminaron gelificando a muy corto plazo, muy difícil de lograr a pH 7 con CaCl_2 . Evidentemente, las diferencias encontradas en el flujo están relacionadas con el tipo de anión.

Los iones modulan varios fenómenos en soluciones acuosa jugando un importante rol en las propiedades fundamentales, como la solubilidad de compuestos relativamente no polares, la organización molecular de agregados y la partición de solutos entre el agua y los solventes orgánicos (Salay y col., 2015). El efecto específico de los iones se conoce en sistemas biológicos y bioquímicos desde 1888 cuando Hofmeister (1888) estableció una serie de eficiencia para la precipitación/solubilización de la clara de huevo, cambiando la especie del anión y manteniendo el catión constante.

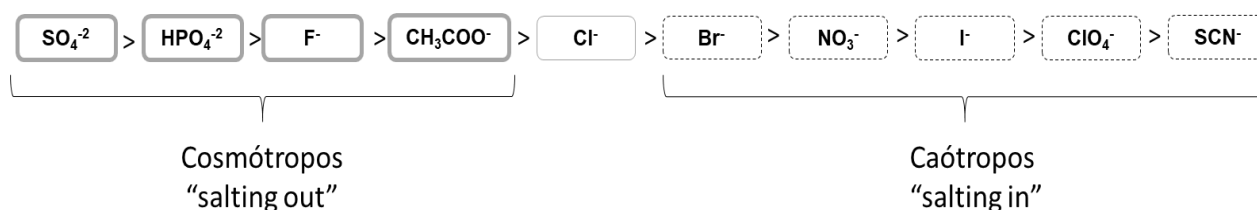


Figura 1.16. Serie liotrópica o serie de Hofmeister para aniones.

La serie liotrópica (del latín “lyo”, significa disolver y “tropos”, τρόπος, del griego, significa tendencia) se muestra en la **Figura 1.16** para los aniones. En ella se considera al Cl^- como neutro. Los miembros de la serie de la izquierda del Cl^- son cosmótopos, es decir, están fuertemente hidratados y decrecen la solubilidad de las proteínas (“salting out”) y los miembros de la derecha del Cl^- son caótopos, es decir, incrementan la solubilidad de las proteínas (“salting in”).

Los aniones cosmótopos, como el Ac^- , no pierden su capa de hidratación fácilmente (Blachechen, 2012). Las moléculas de agua que rodean a los cosmótopos están más fuertemente ligadas que aquellas que se encuentran en el seno del líquido. Los mayores valores de viscosidad del CMP en presencia de Ac^- estarían relacionados a reducción del agua de hidratación disponible, permitiendo así una interacción molecular más fuerte péptido-péptido.

Referencias

- Aep. (2015). "Asociación Española de Pediatría." from <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/acetato-calcico>.
- Ahmed, J.y Ramaswamy, H. S. (2003). "Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide." *Journal of Dairy Science* **86**: 1535-1540.
- Arogundade, L. A., Eromosele, C. O., Eromosele, I. C.y Ademuyiwa, O. (2011). "Rheological properties of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa* Hochst. Ex A. Rich.) calcium proteinate and isoelectric protein isolates." *LWT - Food Science and Technology* **44**(2): 524-534.
- Barreto, P. L. M., Roeder, J., Crespo, J. S., Maciel, G. R., Terenzi, H., Pires, A. T. N., y col. (2003). "Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films." *Food Chemistry* **82**(3): 425-431.
- Blachechen (2012). "Effect of humidity and solvent vapor phase on cellulose esters films." *Celulose* **19**(2): 443-457.
- Burgardt, V. C. F., Oliveira, D. F., Evseev, I. G., Coelho, A. R., Haminiuk, C. W. I.y Waszczynskij, N. (2014). "Influence of concentration and pH in caseinomacropeptide and carboxymethylcellulose interaction." *Food Hydrocolloids* **35**: 170-180.
- Cho, J. J., H.; Jung, H.;, Choi, J. P., S.; Kim, C.;Yang, C.; Jin,; andy Kim, Y. (2018). "A Real-world Cost-effectiveness Analysis of Sevelamer Versus Calcium Acetate in Korean Dialysis Patients." *Clinical Therapeutics* **40**(1): 123–134.
- De Kruif, C. G., Bhatt, H., Anema, S. G.y Coker, C. (2015). "Rheology of caseinate fractions in relation to their water holding capacity." *Food Hydrocolloids* **51**(Supplement C): 503-511.
- Farías, M. E., Martínez, M. J.y Pilosof, A. M. R. (2010). "Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation." *International Dairy Journal*. **20**: 79–88.
- Gómez-Arellano, A., Jiménez-Islas, H., Castrejón-González, E. O., Medina-Torres, L., Dendooven, L., & Escamilla-Silva, E. M. (2017). "Rheological behaviour of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein dispersions." *Food and Bioprocess Technology* **106**: 201-208.
- Hofmeister, F. (1888). "Zur Lehre von der Wirkung der Salze." *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol* **24**: 247-260.
- Huang, J., Zeng, S., Xiong, S.y Huang, Q. (2016). "Steady, dynamic, and creep-recovery rheological properties of myofibrillar protein from grass carp muscle." *Food Hydrocolloids* **61**: 48-56.
- Huppertz, T., P.F.Foxy Kelly (2018). *The caseins: Structure, stability, and functionality. Proteins in Food Processing. Science Direct, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*: 49-92.
- Jaques, L. W., Brown, E. B., Barrett, J. M., Brey, W. S.y Weltner, W. (1977). "Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate." *The Journal of Biological Chemistry* **252**, N° **13**: 4533-4538.
- Kale, M. S., Yadav, M. P., Hicks, K. B.y Hanah, K. (2015). "Concentration and shear rate dependence of solution viscosity for arabinoxylans from different sources." *Food Hydrocolloids* **47**: 178-183.
- Karataş, M.y Arslan, N. (2016). "Flow behaviours of cellulose and carboxymethyl cellulose from grapefruit peel." *Food Hydrocolloids* **58**: 235-245.
- Lacou, L., Léonil, J.y Gagnaire, V. (2016). "Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products." *Food Hydrocolloids* **57**: 187-199.
- Li, S., Donner, E., Thompson, M., Zhang, Y., Rempel, C.y Liu, Q. (2017). "Preparation of branched canola protein isolate and effects of molecular architecture on solution flow properties." *LWT - Food Science and Technology* **79**(Supplement C): 287-293.

- Lin, L., Wong, M., Deeth, H.C., Oh, H.E. (2018). "Calcium-induced skim milk gels using different calcium salts." *Food Chemistry* **245**: 97-103.
- Loveday, S. M., Wang, X. L., Rao, M. A., Anema, S. G., Creamer, L. K.y Singh, H. (2010). "Tuning the properties of β -lactoglobulin nanofibrils with pH, NaCl and CaCl_2 ." *International Dairy Journal* **20**(9): 571-579.
- Ma, J., Lin, Y., Chen, X., Zhao, B.y Zhang, J. (2014). "Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions." *Food Hydrocolloids* **38**: 119-128.
- Martinez, M. J., Farías, M. E.y Pilosof, A. M. R. (2011). "Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating." *Food Hydrocolloids* **25**(5): 860-867.
- Muñoz Noval, Á., Nishio, D., Kuruma, T.y Hayakawa, S. (2018). "Coordination and structure of Ca(II) -acetate complexes in aqueous solution studied by a combination of Raman and XAFS spectroscopies." *Journal of Molecular Structure* **1161**: 512-518.
- Pitkowski, A., Durand, D.y Nicolai, T. (2008). "Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate." *Journal of Colloid and Interface Science* **326**(1): 96-102.
- Pitkowski, A., Nicolai, T.y Durand, D. (2009). "Stability of caseinate solutions in the presence of calcium." *Food Hydrocolloids* **23**: 1164-1168.
- Qunibi, R. H., L. McDowell, Micah S. Meyer,, M. Simon, R. G., R. Pelham, Mark Cleveland,y L. Muenz, D. Y. H., and Charles R. Nolan (2004). "Treatment of hyperphosphatemia in hemodialysis patients: The Calcium Acetate Renagel Evaluation (CARE Study)." *Kidney International* **65**: 1914 - 1926.
- Rajagopal, K.y Schneider, J. P. (2004). "Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications." *Current Opinion in Structural Biology* **14**(4): 480-486.
- Salay, L. C., Petri, D. F. S., Nakaie, C. R.y Schreier, S. (2015). "Adsorption of the antimicrobial peptide tritrypticin onto solid and liquid surfaces: Ion-specific effects." *Biophysical Chemistry* **207**: 128-134.
- Thomar, P., Benyahia, L., Durand, D.y Nicolai, T. (2014). "The influence of adding monovalent salt on the rheology of concentrated sodium caseinate suspensions and the solubility of calcium caseinate." *International Dairy Journal* **37**(1): 48-54.
- Vavrusova, M., Liang, R.y Skibsted, L. H. (2014). "Thermodynamics of Dissolution of Calcium Hydroxycarboxylates in Water." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(24): 5675-5681.
- Villumsen, N. S., Jensen, H. B., Thu Le, T. T., Møller, H. S., Nordvang, R. T., Nielsen, L. R., y col. (2015). "Self-assembly of caseinomacropeptide as a potential key mechanism in the formation of visible storage induced aggregates in acidic whey protein isolate dispersions." *International Dairy Journal* **49**: 8-15.
- Walstra, P. J., R. (1984). *Dairy chemistry and physics* / Pieter Walstra, Robert Jenness, with a contribution by H.T. Badings., New York : Wiley, c1984.
- Wang, G., Liu, M., Cao, L., Yongsawatdigul, J., Xiong, S.y Liu, R. (2018). "Effects of different NaCl concentrations on self-assembly of silver carp myosin." *Food Bioscience* **24**: 1-8.
- Westerik, N., Scholten, E.y Corredig, M. (2015). "The effect of calcium on the composition and physical properties of whey protein particles prepared using emulsification." *Food Chemistry* **177**: 72-80.
- Zhang, Z., Arrighi, V., Campbell, L., Lonchamp, J.y Euston, S. R. (2016). "Properties of partially denatured whey protein products 2: Solution flow properties." *Food Hydrocolloids* **56**: 218-226.

Sección II

Nivel Molecular

¿Por qué es importante estudiar las interacciones de los sistemas CMP/calcio a nivel molecular?

Los resultados macroscópicos se pueden explicar a partir de las interacciones moleculares. La importancia de estudiar la interacción a nivel molecular entre el CMP y el calcio radica en intentar comprender las diferencias encontradas en el comportamiento de flujo del CMP en presencia de CaCl_2 o CaAc_2 . Para ello, se eligió utilizar como metodología a la determinación del tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS), técnica que tiene su expresión en las propiedades de flujo (Arzeni y col., 2012). Si no hay interacción entre el CMP y el calcio se esperaría que los tamaños de partícula característicos para el CMP se mantengan. Un cambio en el tamaño sería indicativo de una interacción molecular. Esta metodología se ha utilizado con este fin en diferentes trabajos (Martinez y col., 2009b; Martinez y col., 2009c; Semenova, 2009; Martinez y col., 2010; Pizones Ruiz-Henestrosa V.M., 2012). En esta Sección II, se caracterizó en primer lugar la distribución de tamaños de partícula del CMP solo (en ausencia de sales) y se estudió el efecto de la concentración, el pH y la temperatura sobre dicho parámetro. Luego, se evaluó el efecto de la incorporación de CaCl_2 y CaAc_2 sobre la asociación molecular del CMP. Adicionalmente se analizaron los espectros FTIR como herramienta complementaria. Esta técnica es especialmente útil para el estudio de compuestos orgánicos ya que la abundancia de bandas de absorción específicas garantiza poder identificar compuestos puros o modificaciones. A través de esta técnica se pueden observar modificaciones a nivel molecular e identificar cuáles son los grupos funcionales que intervienen en la unión del CMP con el calcio.

Objetivo:

El objetivo de esta Sección II fue caracterizar a nivel molecular las interacciones entre el CMP y el calcio proveniente de las sales CaCl_2 o CaAc_2 en solución a pH neutro. Para ello se utilizaron dos técnicas: Dispersión Dinámica de Luz, (DLS, de sus siglas en inglés) y Espectroscopía IR por Transformada de Fourier (FTIR).

II.1. Caracterización de la asociación molecular del CMP a pH neutro

A fin de estudiar la asociación del CMP y el calcio proveniente de las sales de calcio antes mencionadas, se caracterizó en primer lugar las distribuciones de tamaños de partícula del CMP solo (en ausencia de sales) en relación a las variables de interés: concentración, pH y temperatura, y se caracterizó el espectro FTIR del CMP a pH 7. Las condiciones elegidas fueron las siguientes:

II.1.1. Las distribuciones de tamaños de partícula por intensidad y volumen se realizaron en un rango de concentración variable de CMP (de 1 a 8% p/p) a pH 7 y 25 °C. Por razones de limitación de la técnica no fue posible medir soluciones más concentradas.

II.1.2. Efecto del pH sobre la asociación molecular del CMP a través de las distribuciones de tamaños de partícula por intensidad y volumen del CMP al 5% p/p a pH 5, 6, 8 y 9 (valores del entorno del pH neutro).

II.1.3. Caracterización del espectro FTIR del CMP solo a pH 7,0.

II.1.1. Efecto de la concentración sobre el estado de asociación del CMP.

Para comprender los resultados del comportamiento de flujo del CMP, es importante analizar si puede existir una asociación molecular por la concentración a pH neutro donde el CMP se presenta principalmente como monómero. Este estudio fue realizado en la tesis doctoral de Farias (2012) donde se analizó la distribución de tamaños de partícula por intensidad obtenida por Dispersión Dinámica de Luz (DLS) de soluciones de CMP a pH 7 y 25 °C a diferentes concentraciones: 1, 3, 5 y 8% (p/p) (**Figura 1.17 A**). Las distribuciones fueron multimodales para todas las concentraciones, pero más del 58% de la señal de intensidad correspondió a las partículas de tamaños más pequeños ($\approx 2,8$ nm). La representación en volumen (**Figura 1.17 B**), mostró que, la población predominante fue en todos los casos la correspondiente al primer pico, indicando que la mayoría de las partículas tienen tamaños menores a 5 nm. A través del software del equipo, que permite estimar el peso molecular, se puede afirmar que a pH 7,0 la forma predominante del CMP es la monomérica, independientemente de la concentración utilizada, y que corresponde a un diámetro hidrodinámico, $d(H)$, de 2,3 nm. La variación del ancho del pico predominante entre 1 y 5 nm indica que también están presentes dímeros, trímeros y tetrámeros (Farías y col., 2010).

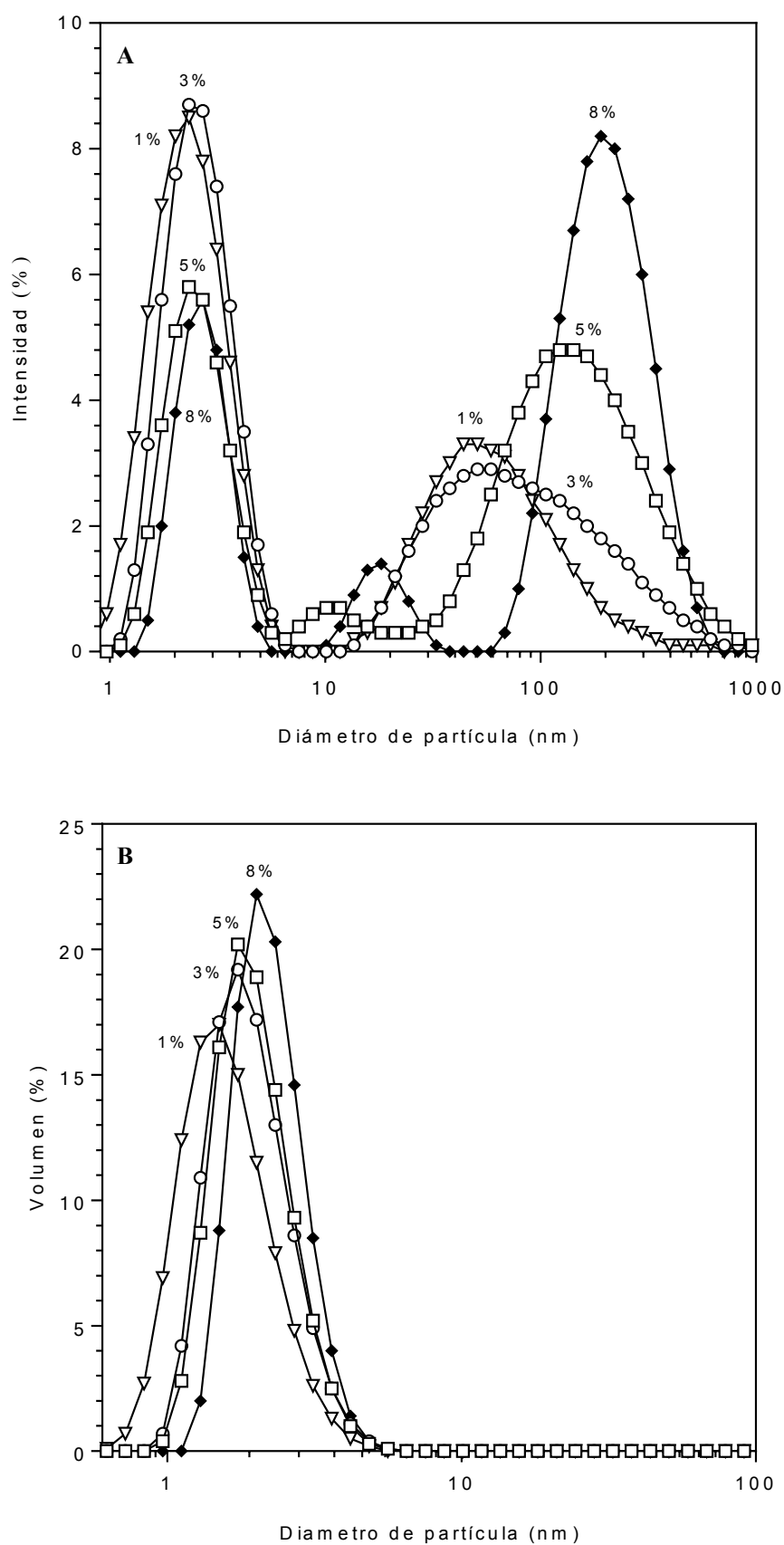


Figura 1.17. Distribución de tamaños de partícula por Intensidad (**A**) y Volumen (**B**) de soluciones de CMP a pH 7,0 y 25 °C a diferentes concentraciones: 1 (▽); 3 (○); 5 (□) y 8 % p/p (♦). Adaptación de Farias (2012).

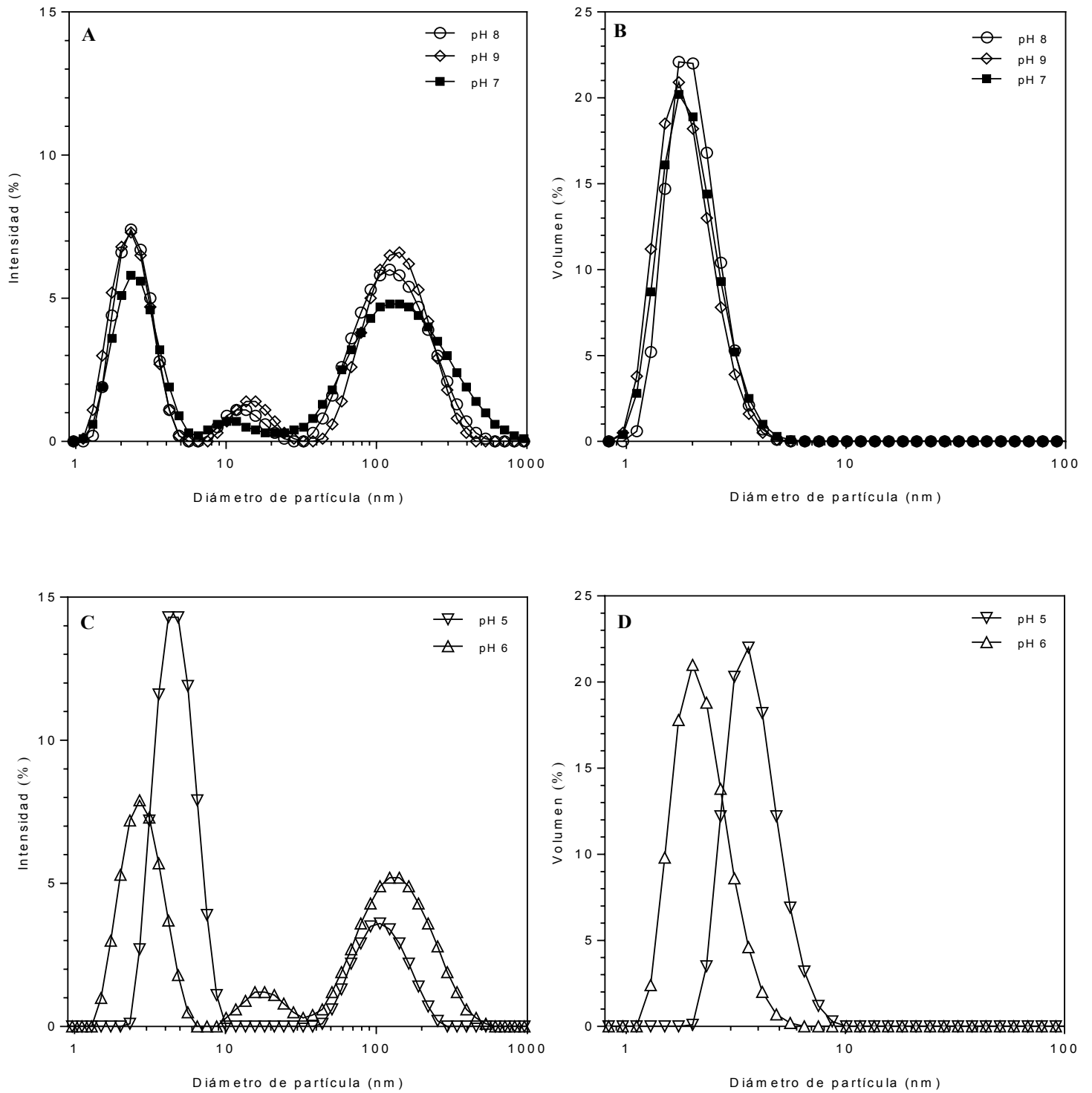


Figura 1.18. Distribuciones de tamaños de partícula por intensidad y volumen para soluciones de CMP al 5 % (p/p) a 25 °C y a diferentes valores de pH: 7 (■); 8 (○); 9 (◇) (A y B); 5 (▽) y 6 (△) (C y D).

II.1.2. Efecto del entorno de pH (entre 5,0 y 9,0) y la temperatura

Se realizaron las distribuciones de tamaños de partícula por dispersión dinámica de luz láser (DLS), según la técnica descrita en la **Sección 2.3**, de **Materiales y Métodos**, para el CMP a una concentración de 5 % p/p y a diferentes valores de pH (entre 5,0 y 9,0). Las distribuciones por intensidad fueron multimodales (**Figuras 1.18 A y C**) pero la representación en volumen (**Figuras 1.18 B y D**) mostró que la población predominante fue, en todos los casos, la correspondiente al primer pico. Tal como se observó en el apartado anterior, a pH 7,0 la forma predominante del CMP fue la monomérica y su $d(H)$ fue de 2,3 nm, resultados congruentes con los hallados en Farías y col. (2010). Las muestras a pH entre 7,0 y 9,0 tuvieron una distribución de tamaños de partícula y un Z-ave (13,1 nm) muy similar donde predominaron las moléculas individuales de CMP (monómeros de 2,3 nm) (**Figuras 1.18 A y B**).

Por otro lado, en estos ensayos, se observaron picos de mayores tamaños de partícula por intensidad que fueron despreciables en volumen (**Figura 1.18 A y C**). Estos picos podrían corresponder a micelas de CMP que pueden explicarse a raíz de su naturaleza surfactante. Según Martínez y col. (2009a), las isotermas de presión superficial de las soluciones de CMP mostraron un comportamiento sigmoidal típico de biopolímeros y surfactantes. Además, encontraron que la cinética de difusión del CMP en la interfaz aire - agua no fue afectada por la etapa de difusión, característica de los tensioactivos de bajo peso molecular. Esta interpretación constituye otra posible explicación a las diferencias en el comportamiento de flujo a pH 7,0 - 9,0 que se observaron en el apartado I.1.2., de la Sección I. El ligero comportamiento pseudoplástico a pH 7,0 – 9,0 antes expuesto podría explicarse tanto por la orientación de las micelas en la dirección del flujo como por las interacciones entre el CMP y el agua.

A pH 5,0 - 6,0, las distribuciones de tamaños en intensidad y volumen de las soluciones a pH 5,0 (Z-ave 6,2 nm, forma predominante: tetrámeros de 4,2 nm) fueron claramente diferentes que a pH 6,0 (Z-ave 9,8 nm, forma predominante: monómeros) (**Figuras 1.18 C y D**). A pH 6,0, el ancho del primer y predominante pico de 1,3 a 5,6 nm, demuestra la presencia de un mayor número de dímeros y tetrámeros que a pH 8,0 y 9,0 (1,1 - 4,8 nm). Según Mikkelsen y col. (2005), la forma tetramérica del CMP es más hidrofóbica que la forma dimérica y monomérica. La tendencia al comportamiento de flujo newtoniano descrito en el apartado I.1.2 de la Sección I de

estas soluciones a pH 5,0 - 6,0 podría explicarse por el aumento de la hidrofobicidad, que disminuye las interacciones del agua con el péptido y no por su grado de asociación.

Es importante señalar que las soluciones de CMP a pH > 4,5 no mostraron ningún cambio en la distribución de tamaños de partícula al someterse al calentamiento según lo reportado por Martinez y col. (2011). Este comportamiento distingue al CMP de las otras proteínas del lactosuero, las cuales se desnaturalizan a altas temperaturas con el consecuente aumento de la viscosidad (Gómez-Arellano, 2017).

II.1.3. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier del CMP a pH neutro

La técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier se sustenta en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, típicamente entre 4000 y 400 cm^{-1} . La energía absorbida se relaciona con la frecuencia de vibración natural de cada una de las uniones presentes en las moléculas y, por lo tanto, puede identificarse la presencia de variados tipos de uniones, así como grupos funcionales. Los espectros se realizaron según la técnica descrita en la **Sección 2.5, de Materiales y Métodos**.

El espectro FTIR del caseinomacropéptido (**Figura 1.19**) fue similar al obtenido por Burgardt y col. (2014), quienes utilizaron un material del mismo proveedor. En un espectro FTIR se distinguen principalmente dos zonas: una región de huella digital o fingerprint (1300 - 600 cm^{-1}) y otra región correspondiente a los grupos funcionales (4000 - 1300 cm^{-1}). Esta última región da información para identificar el tipo y carga de los grupos, mientras que la región de la huella digital indica las características estructurales de la molécula (Wang y col., 2017).

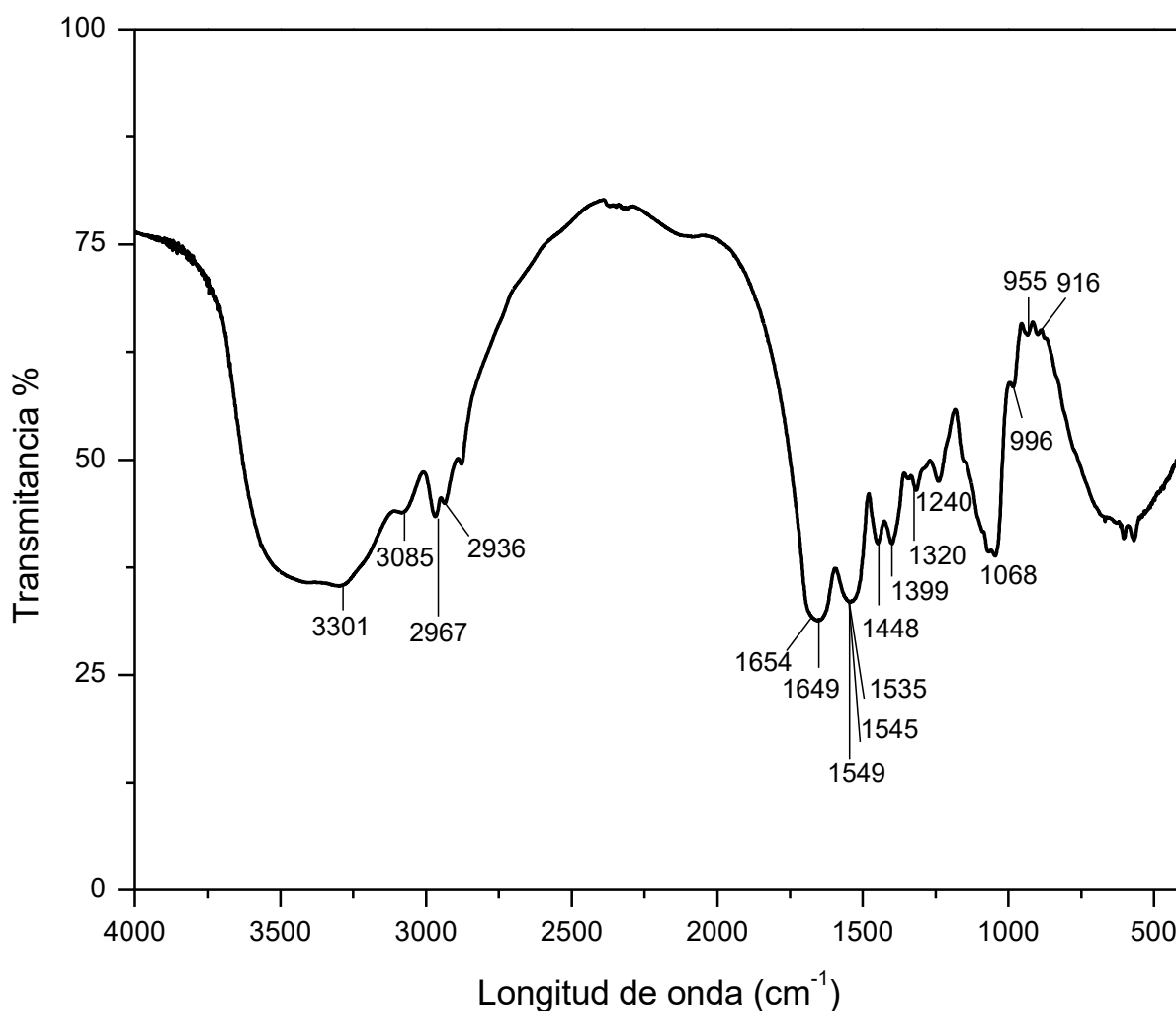


Figura 1.19. Espectro FTIR del CMP a pH 7.

En el espectro de la **Figura 1.19** se puede observar una banda ancha e intensa entre 3400 y 3300 cm^{-1} . Se debe a un solapamiento de bandas correspondientes a la vibración de los estiramientos O–H, libre o unido (Burgardt y col., 2014). Las absorciones de tensión N–H tienen lugar a frecuencias ligeramente más bajas que las absorciones de tensión del O–H. Las bandas de las amidas secundarias A y B se encuentran a 3300 cm^{-1} y 3080 cm^{-1} , respectivamente (Burgardt y col., 2014).

La banda de la amida A corresponde al estiramiento del enlace N–H en la formación de la unión puente hidrógeno N–H mientras que la amida B resulta de la resonancia de FERMI de la vibración del estiramiento N–H con el sobretono de la vibración de la amida II (Twardowski y Anzenbacher, 1994). Según Burgardt y col. (2014) estas bandas también están relacionadas con el aminoácido prolina, que es abundante en el CMP. Las bandas observadas en 2970 y 2940 cm^{-1} refieren a vibraciones simétricas y asimétricas del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) (Abraham y col., 2008).

La vibración de la amida I, que es causada principalmente por los estiramientos del enlace C=O, se mide en el rango de 1700 a 1600 cm^{-1} , mientras que, la vibración de la amida II, que se produce por la deformación de los enlaces N-H y por los estiramientos de los enlaces C-N, se mide en el rango de 1600 a 1500 cm^{-1} (Curley, 1998). Estos son los modos vibracionales más importantes de las amidas. Las frecuencias exactas a las que estos enlaces absorben dependen de la estructura secundaria de las proteínas o péptidos. En el espectro del CMP estas bandas se observan en 1649 cm^{-1} y 1549 cm^{-1} , y se atribuyen a las vibraciones de amida I y II respectivamente. La banda de amida III a 1240 cm^{-1} representa la combinación entre la vibración del estiramiento C-N, la flexión del enlace N-H de la amida y las vibraciones de los grupos CH_2 del esqueleto de la glicina y de las cadenas laterales de la prolina (Jackson, 1995).

Una de las bandas especialmente significativas en el CMP es la correspondiente al grupo funcional carboxilato (COO^-). Los carboxilatos producen una vibración a los 1400 cm^{-1} que caracteriza la coordinación de los iones metálicos divalentes (Nara, 2008). La banda a 1320 cm^{-1} es atribuida al grupo CO-N (amina) (Burgardt y col., 2014). El CMP está glicosilado, y la señal de absorción en la región de la huella digital se encuentra entre 1200 y 1000 cm^{-1} (Khajepour y col., 2006). Según Lewis y col. (2013) el ácido siálico tiene una señal característica a 1024 cm^{-1} , la N-Acetilglucosamina (GlcNAc) a 1025 cm^{-1} y la N-Acetilgalactosamina (GalNAc) a 1038 cm^{-1} . Los sitios fosforilados del CMP (Ser 149 y 127) dan una escasa señal a 990 cm^{-1} (Carmona y Rodríguez, 1986). Las bandas presentes a 935 y 900 cm^{-1} estarían relacionadas con la galactosa (Burgardt y col., 2014).

II.1.4. Conclusiones parciales

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que las moléculas de CMP forman espontáneamente micelas a $\text{pH} > 4,5$, ya que el carácter anfifílico (necesario para la formación de micelas) se manifiesta al aumentar la carga negativa con el pH. A pH 7,0 el CMP se encuentra principalmente como monómeros con un $d(H)$ de 2,3 nm que no fue afectado por la concentración de CMP ni por la temperatura, pero sí por la disminución del pH a valores de 5,0 o 6,0 en el cual la forma molecular predominante del CMP fueron los tetrámeros. Por otro lado, se logró caracterizar al espectro FTIR del CMP en ausencia de sales y a pH neutro.

II.2. Caracterización de la asociación molecular del CMP en presencia de CaCl_2 a pH neutro

II.2.1. Efecto de la adición de CaCl_2 sobre el estado de asociación del CMP por DLS

La **Figura 1.20** muestra la distribución de tamaños de partícula de las soluciones de CMP inmediatamente después de ajustar el pH a 7 y el efecto de la adición de CaCl_2 . Como fue informado previamente, la distribución de tamaños por intensidad en soluciones de CMP en ausencia de sal presentó tres poblaciones (**Figura 1.20 A**). El diámetro hidrodinámico $d(H)$ del primer pico, que fue el predominante, se encontró entre 1 y 5 nm con un valor máximo de 2,3 nm correspondiente a la forma monomérica del CMP (masa molecular promedio $\approx 7,5$ kDa). El $d(H)$ del primer y predominante pico exhibió cambios significativos a medida que aumentó el CaCl_2 adicionado (**Figura 1.20 A**). Notablemente, se alcanzó un grado de asociación máximo para una concentración crítica de CaCl_2 de 60 mM (**Figura 1.20 B**), donde el $d(H)$ del pico predominante fue de 5,6 nm y correspondió a la forma hexamérica del CMP. Esta concentración corresponde a la relación de *1,2 mmoles de CaCl_2 /g CMP*. Se observó en la distribución de tamaños por volumen (**Figura 1.20 B**) que el pico correspondiente a las micelas ($d(H) \cong 100$ nm) fue despreciable.

También, la adición de CaCl_2 a las soluciones acuosas de caseinato de sodio causa la formación de agregados, pero en el orden del micrón (Pitkowski y col., 2009). Según estos autores, este efecto se relaciona con una unión específica entre el calcio y las fracciones de caseína y la reducción de la repulsión electrostática entre las moléculas, esta interacción termina finalmente en la agregación y precipitación del caseinato (Carr y Munro, 2004).

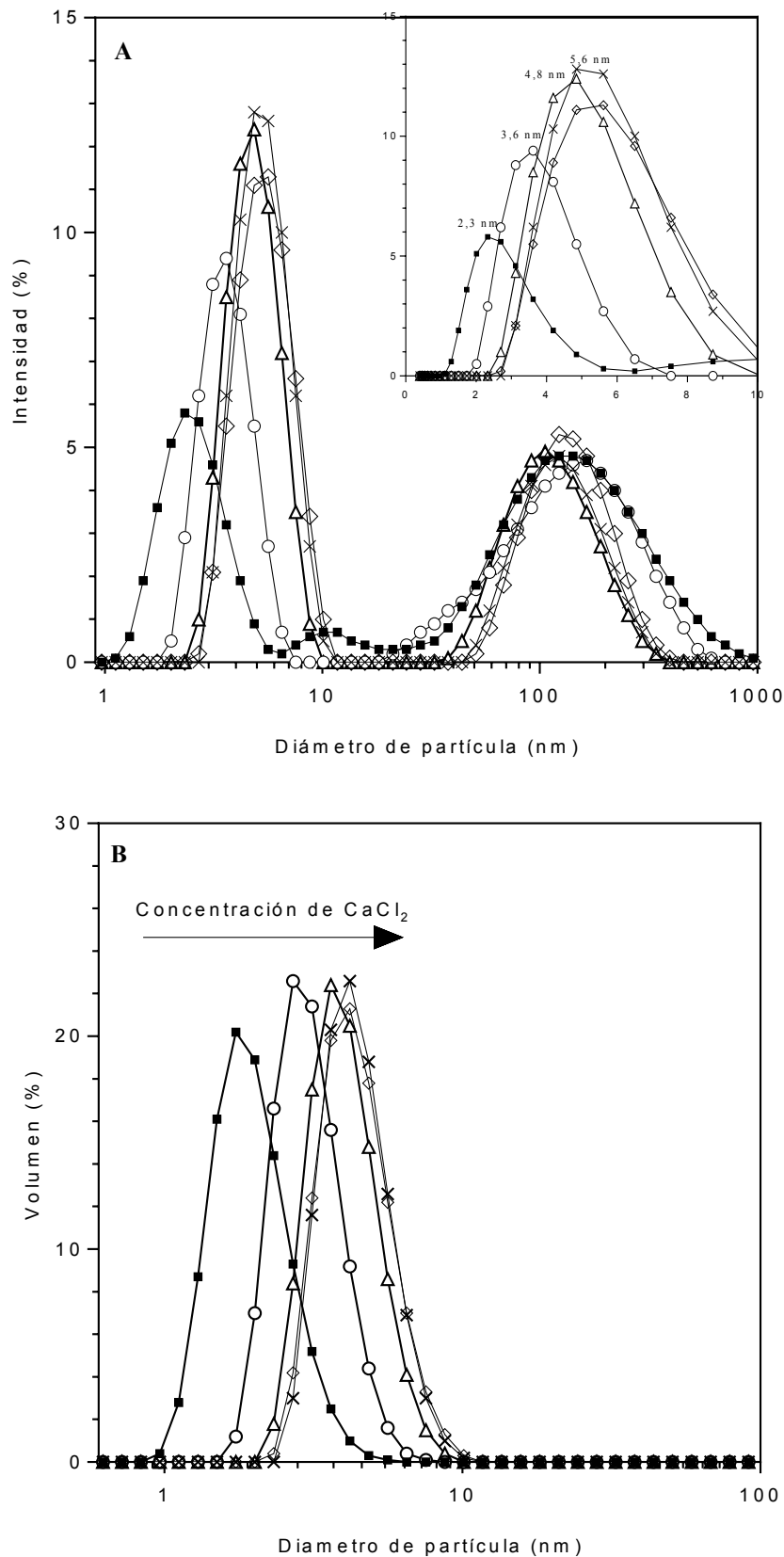


Figura 1.20. Distribuciones de tamaños de partícula por intensidad (**A**) y volumen (**B**) de soluciones de CMP 5 % (p/p) inmediatamente después de ajustar el pH a 7 y 25 °C con diferentes concentraciones de CaCl_2 : 0 (■); 10 (○); 40 (△); 60 (X); y 200 (◇) mM. En la **Figura A** se insertó una vista ampliada del primer pico con una escala lineal.

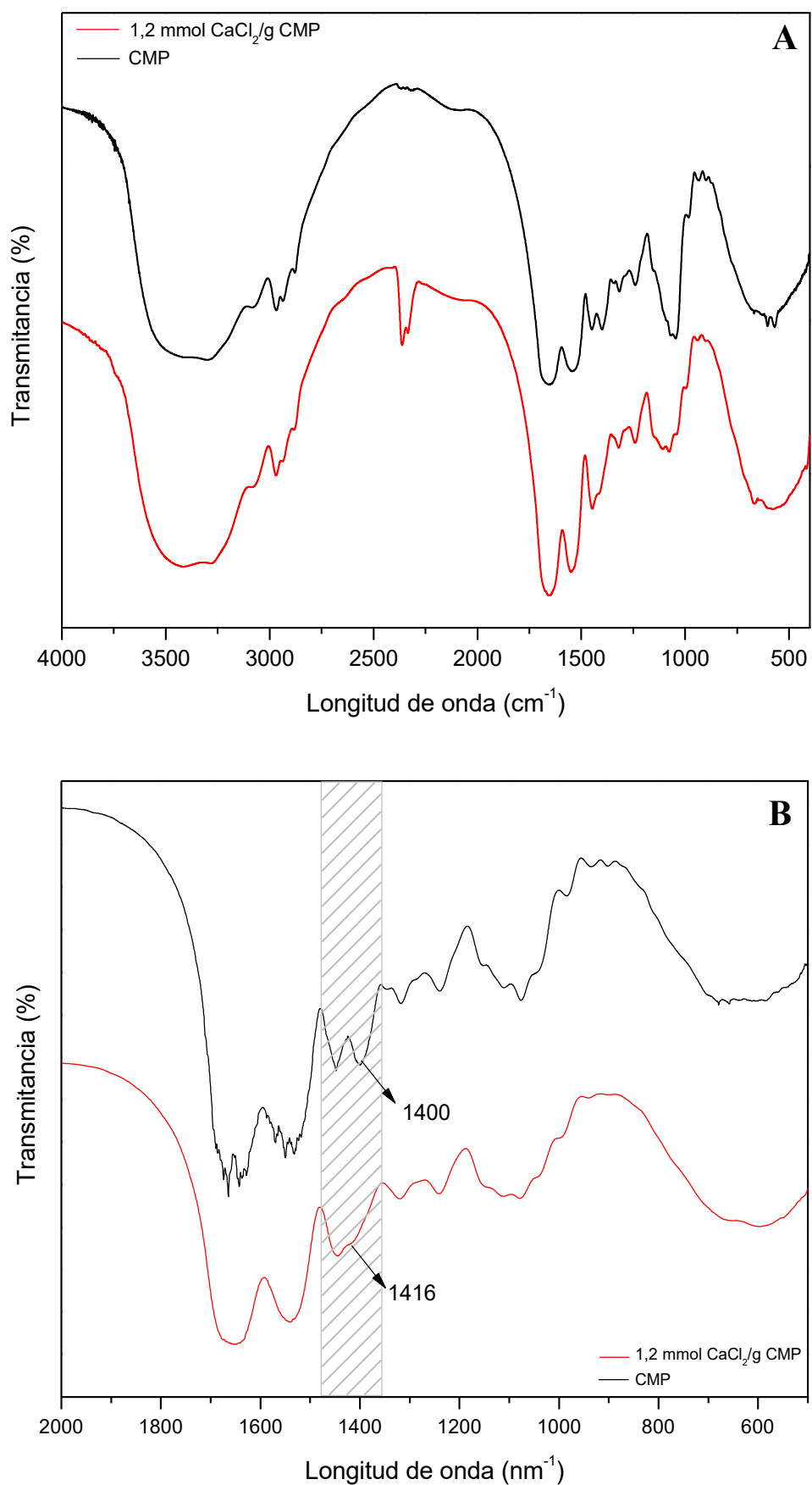


Figura 1.21. Espectro FTIR del CMP en ausencia de sales (–) y en presencia de 180 mM de CaCl₂ (–). Relación 1,2 mmol CaCl₂/ g CMP (A). Vista ampliada entre 500 y 2000 cm⁻¹ (B).

II.2.2. Espectro FTIR del CMP a pH neutro en presencia de CaCl_2

Los espectros del CMP en ausencia y presencia de cloruro de calcio se muestran en la **Figura 1.21**. Se eligió la concentración óptima que se observó previamente en los estudios previos de DLS y reología de flujo, de $1,2 \text{ mmoles de } \text{CaCl}_2/\text{g CMP}$. Al comparar los dos espectros (con y sin CaCl_2) se distinguen diferencias que brindan información en la estructura molecular, por ejemplo, desplazamientos hacia el rojo o hacia el azul, incremento o reducción de picos. La absorción a alta frecuencia de 3301 cm^{-1} (Amida 2° A) que se atribuye a la vibración de estiramientos N-H cambió a 3283 cm^{-1} y el de la Amida 2° B de 3080 a 3088 cm^{-1} . Este cambio podría deberse a que los grupos N-H se reemplazarían por uniones N-Ca como describieron Peng y col. (2017) y Wang y col. (2017) para otros péptidos. La banda de Amida I a 1649 cm^{-1} para el CMP/ CaCl_2 , se debería a que los grupos C-O participarían en la interacción del péptido con el Ca^{2+} (Wu y col., 2019). En la región de la Amida II han desaparecido los picos correspondientes al número de onda 1535 y 1545 cm^{-1} , encontrándose un valle en el espectro del CMP/ CaCl_2 .

Fundamentalmente, la banda de 1400 cm^{-1} correspondiente a los grupos carboxílicos (COO^-) se desplazó hacia frecuencias mayores (1416 cm^{-1}) en el espectro del CMP/ CaCl_2 (**Figura 1.21 B**).

Wang y col. (2017) estudiaron a través de espectroscopía FTIR el efecto de la interacción del CaCl_2 y un péptido proveniente de la fermentación con *B. subtilis* de semillas de pepino. Los autores hallaron, al comparar el espectro en ausencia y presencia de calcio, cambios similares a los de esta tesis. Encontraron un pico a 3416 cm^{-1} que se desplazó a 3424 cm^{-1} que atribuyeron a la participación de los grupos -NH en la coordinación con el Ca^{2+} . Los autores observaron un desplazamiento desde 1402 cm^{-1} en el espectro del péptido libre hacia frecuencias mayores (1420 cm^{-1}) en presencia de calcio y lo atribuyeron al estiramiento del grupo carboxilato $-\text{COO}^-$ por la combinación con Ca^{2+} para formar $-\text{COO}-\text{Ca}$. Finalmente, concluyeron que los principales sitios de coordinación entre el calcio y el péptido estudiado fueron los grupos $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ y $-\text{CO}-\text{NH}$.

Por otro lado, Peng y col. (2017) estudiaron la afinidad por el CaCl_2 de un péptido proveniente del colágeno de hueso de pescado (*Gadus macrocephalus*). El espectro FTIR del péptido con calcio mostró que la banda de 3381 cm^{-1} se desplazó a 3361 cm^{-1} , la banda correspondiente a la vibración de amida I (1646 cm^{-1}) se desplazó a 1658

cm^{-1} y la de amida II (1558 cm^{-1}) a 1549 cm^{-1} . Además, la banda de 1455 cm^{-1} se desplazó a 1411 cm^{-1} . Los autores concluyeron, a partir de los cambios observados por esta técnica, que ese péptido quelaba iones calcio principalmente a través de interacciones con los átomos del nitrógeno del grupo amino y los átomos de oxígeno del grupo carboxílico. Los péptidos con gran afinidad por el calcio típicamente contienen una gran cantidad de Glu y Asp, ya que contribuyen a la unión del calcio posiblemente al generar un ambiente ácido para que los cationes se coordinen (Peng y col., 2017). Las proteínas del hueso de pescado contienen altas proporciones de Gly, Glu y Arg, que tienen una alta afinidad por el calcio. En la secuencia aminoacídica de la variante A del CMP se encuentran 10 de estos aminoácidos ácidos: 8 residuos de Glu y 2 de Asp. Otras investigaciones (Tuan, 1987; Choi, 2012) muestran que los aminoácidos básicos también tienen afinidad con el calcio principalmente causada por los grupos $-\text{NH}_2$ o $-\text{NH}$ que pueden participar en la coordinación con el calcio. Los aminoácidos básicos son: Lys, Arg y His, de los cuales el CMP contiene 3 residuos de Lys.

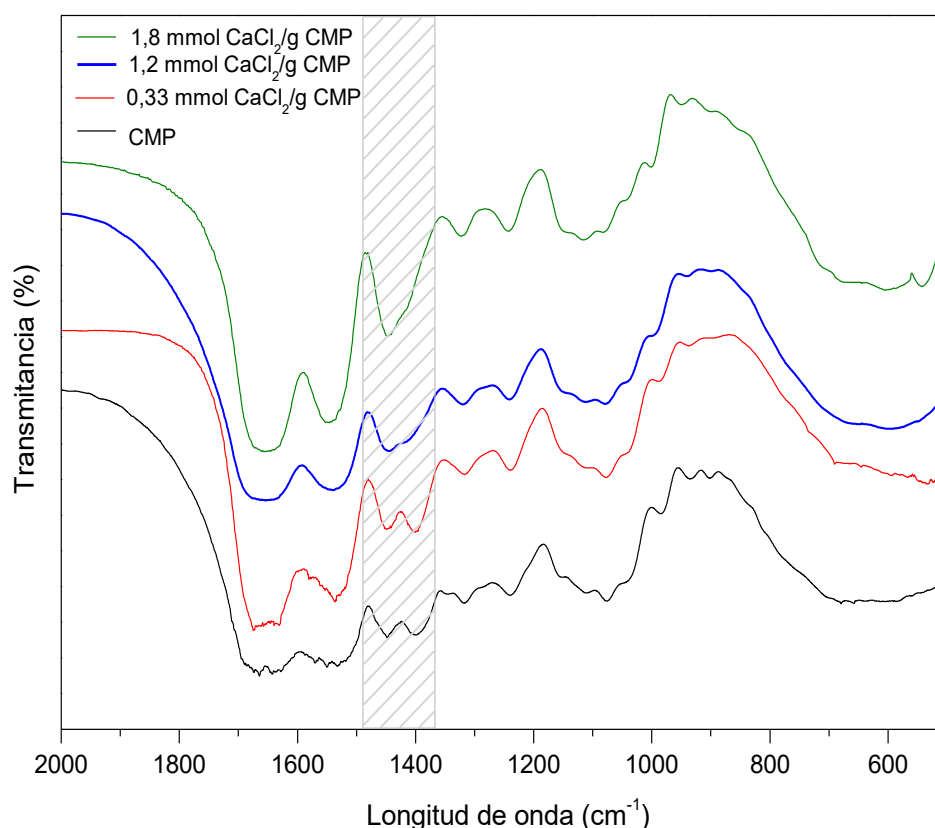


Figura 1.22. Espectro FTIR parcial del CMP con diferentes relaciones CaCl_2/CMP , desde 2000 a 500 cm^{-1} .

Tabla 1.4. Asignación de picos en los espectros FTIR del CMP en ausencia de sales y con 1,2 mmoles de CaCl_2 /g CMP a pH 7,0. Se marcan en negrita las discrepancias con respecto al espectro de CMP sin sales.

Las

Región		Longitud de onda de CMP (cm^{-1})	Longitud de onda de CMP/ CaCl_2 (cm^{-1})
Grupos Funcionales (4000-1300 cm^{-1})	Amida 2° A (3300 cm^{-1})	3301	3283
	Amida 2° B (3080 cm^{-1})	3080	3088
	Amida I (1700-1600 cm^{-1})	1649	1650
		1655	1656
	Amida II (1600-1500 cm^{-1})	1535	-
		1545	-
		1549	1548
	Amida III (1240 cm^{-1})	1239	1241
	CH_3 - (2970 cm^{-1})	2967	2968
	CH_3 - (2940 cm^{-1})	2936	2937
			2945
	CH_2 - (1450 cm^{-1})	1448	1447
	COO^- (1400 cm^{-1})	1400	1416
	Aminas CO-N (1320 cm^{-1})	1317	1319
Huella digital (1300-400 cm^{-1})	Residuos glicosilados (1075 cm^{-1})	1076	1077
	P-O (990 cm^{-1})	984	997
		901	901
	Picos de baja intensidad (900-935 cm^{-1})	916	921
		935	940

asignaciones del espectro fueron adaptadas de Wang y col. (2017)

En la **Figura 1.22** se muestran los espectros FTIR del CMP con diferentes concentraciones de CaCl_2 . Las relaciones entre el CaCl_2 y el CMP están informadas en cada uno de los espectros y son: 0,33; 1,2 y 1,8 mmol de CaCl_2/g de CMP. Se eligieron estas relaciones a partir de los resultados hallados en DLS, buscando analizar la interacción molecular del CMP y el calcio en una relación por encima y por debajo de la hallada como óptima (1,2 mmol de CaCl_2/g CMP). En los espectros superpuestos de la **Figura 1.22** puede apreciarse que el corrimiento del pico de 1400 cm^{-1} a 1416 cm^{-1} sólo se observa para una relación CaCl_2/CMP igual o superior a 1,2 mmoles de Ca^{2+}/g de CMP. Esto indica que debe existir una cierta cantidad de iones Ca^{2+} en el medio para propiciar la unión con el CMP.

II.2.3. Conclusiones parciales

A pH 7,0, el CMP se encuentra formando moléculas individuales (monómeros), pero si se adiciona CaCl_2 , las cargas electroestáticas se apantallan y los residuos hidrofóbicos de la molécula de CMP pueden interaccionar. Los resultados de DLS indicaron que cuando la concentración de cloruro de calcio es superior a 60 mM (relación 1,2 mmol CaCl_2/g de CMP), se alcanza el máximo estado de asociación, el hexámero. La presencia de calcio iónico en exceso permite el crecimiento del tamaño de las partículas. Estas estructuras grandes de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{m}$ son las que afectan la transparencia y la viscosidad de las soluciones de CMP y CaCl_2 bajo almacenamiento descritas en la Sección I.

Los espectros FTIR de CMP/CaCl_2 confirmaron que en presencia de calcio iónico se evidencia principalmente un corrimiento en la posición de los grupos carboxilatos (COO^-) desde 1400 cm^{-1} a 1416 cm^{-1} que indicarían interacción para una relación de **1,2 mmoles de Ca^{2+}/g CMP** o superior.

II.3. Caracterización de la asociación molecular del CMP en presencia de CaAc₂ a pH neutro.

II.3.1. Efecto de la adición de CaAc₂ sobre la asociación del CMP por DLS

Se analizaron por DLS soluciones de CMP al 5 % (p/p), a pH 7,0 y 25 °C y concentraciones variables de CaAc₂. La **Figura 1.23 A** muestra la distribución de los tamaños de partícula por intensidad de las soluciones de CMP 5 % (p/p) y a diferentes concentraciones de CaAc₂ que van desde 10 mM hasta 100 mM. La población predominante fue, para todas las concentraciones, la correspondiente al pico más pequeño según puede observarse en la distribución de tamaños por volumen (**Figura 1.23 B**). Con la adición de CaAc₂, el $d(H)$ del primer y predominante pico exhibió cambios significativos y el desplazamiento fue desde 2,3 nm (libre de sal) hasta 5,6 nm (40 mM de CaAc₂), tamaño que correspondió a la forma hexamérica de CMP y que no fue modificado con la incorporación de mayor cantidad de CaAc₂.

Según Mohammadzadeh-Aghdash y col. (2017), el principal modo de interacción del anión acetato con la seroalbúmina bovina a pH 7,0 (en buffer fosfato) es a través de interacciones hidrofóbicas. Estos autores llegaron a esta conclusión al observar cómo disminuyó la fluorescencia de esa proteína en presencia de acetato de sodio. Lamentablemente, por la ausencia de aminoácidos aromáticos en la cadena peptídica, este ensayo no fue posible de realizarlo en las soluciones de CMP.

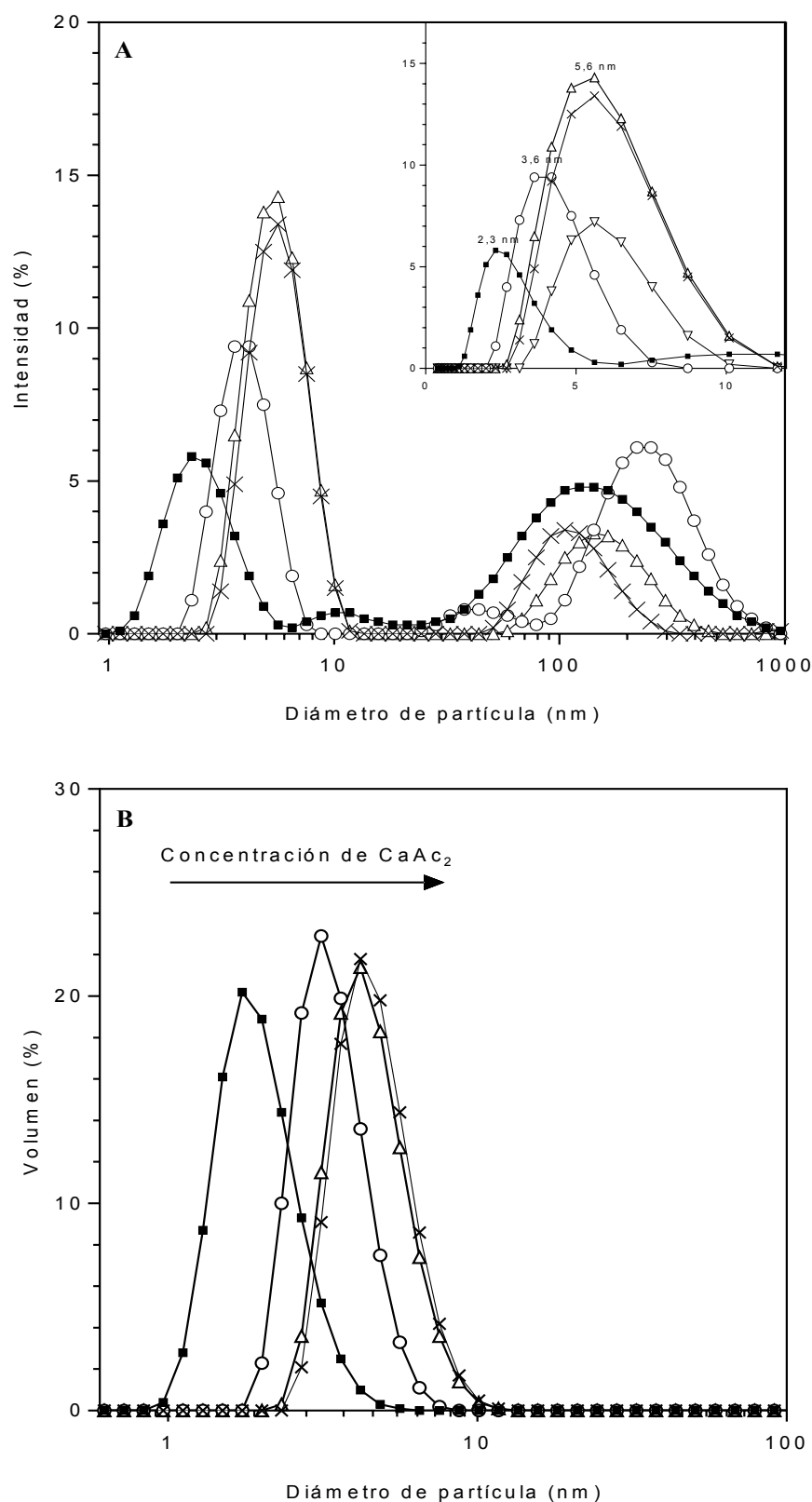


Figura 1.23. Distribución de tamaños de partícula por Intensidad (**A**) y volumen (**B**) para soluciones de CMP 5 % (p/p) a 25 °C y pH 7,0 a diferentes concentraciones de CaAc_2 : 0 (■); 10 (○); 40 (△) y 60 (×). En la **Figura A** se insertó una vista ampliada del primer pico con una escala lineal.

II.3.2. Espectro FTIR del CMP a pH neutro en presencia de CaAc_2

Los espectros del CMP y el acetato de calcio se muestran en la **Figura 1.24**, en la relación 1,2 mmol CaAc_2/g CMP. Como es posible observar, no hubo grandes diferencias entre ellos y no se encontraron cambios en la banda de 1400 cm^{-1} correspondiente a los estiramientos COO^- , a diferencia de lo observado en el espectro del CMP y el CaCl_2 . Una posible explicación a esta diferencia observada es que la especie predominante que interacciona con el CMP no es el Ca^{2+} sino el CaAc^+ .

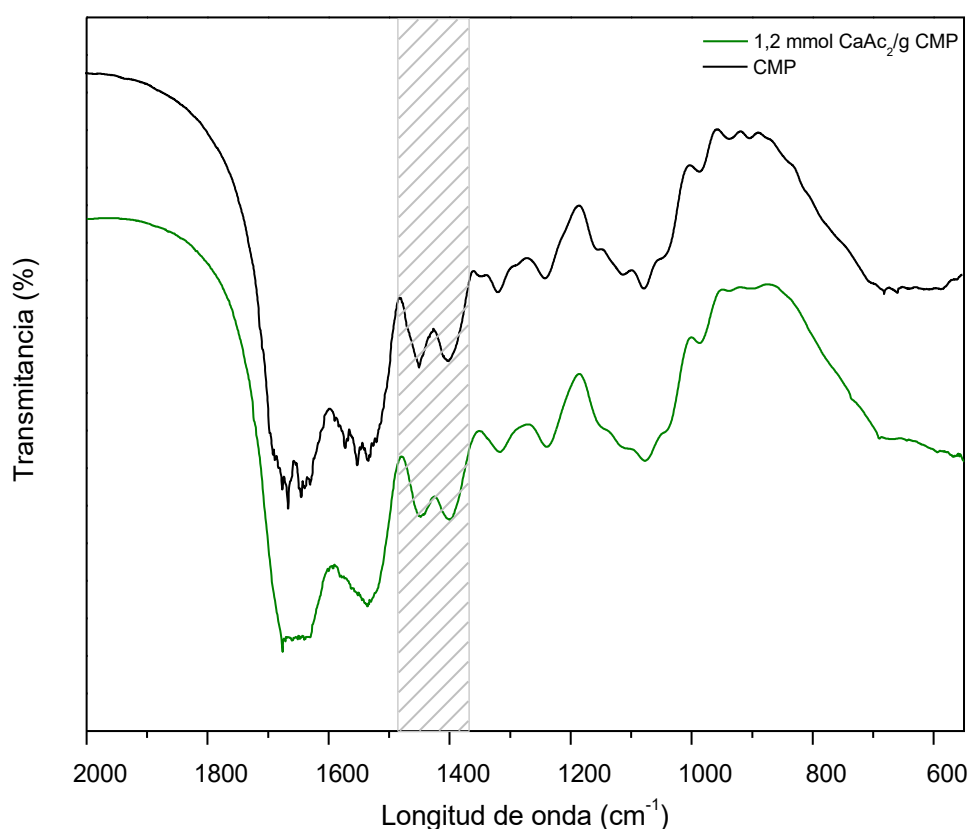


Figura 1.24. Espectro FTIR parcial del CMP en ausencia de sal (–) y en presencia de CaAc_2 en la relación 1,2 mmol CaAc_2/g CMP desde 2000 a 600 cm^{-1} .

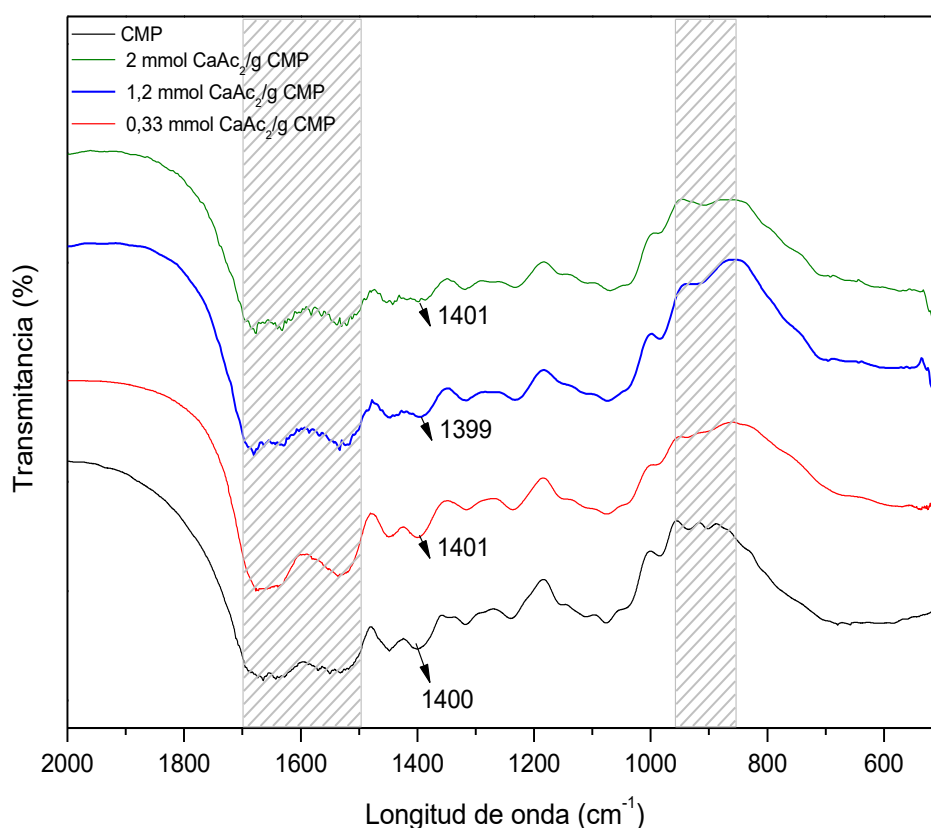


Figura 1.25. Espectro FTIR parcial del CMP y CaAc₂ en diferentes relaciones: 0,33; 1,2 y 2 mmol CaAc₂/g CMP desde 2000 a 500 cm⁻¹.

En la comparación de los espectros de CMP con distintas concentraciones de CaAc₂ en las relaciones correspondientes a 0,33, 1,2 y 2 mmol CaAc₂/g CMP (**Figura 1.25**), se observaron modificaciones en la absorbancia de la zona de los picos de baja intensidad (935 - 900 cm⁻¹) y un incremento en la intensidad de las señales de Amida I (1700 - 1600 cm⁻¹) y Amida II (1600 - 1500 cm⁻¹) con la concentración de CaAc₂, pero en ningún caso se observaron cambios en la banda de 1400 cm⁻¹ correspondiente a los estiramientos COO⁻.

II.4. Discusión y Conclusión de la Sección II

Los ensayos de DLS mostraron similitudes y diferencias entre el CaCl_2 y el CaAc_2 . En ambos casos, se obtuvo una concentración crítica y en la cual el CMP se asoció y alcanzó un $d(H)$ máximo (5,6 nm) (**Tabla 1.5**). Dicha concentración fue 60 mM para el CaCl_2 y 40 mM para el CaAc_2 . Es importante destacar que las soluciones de cloruro y acetato de calcio con la misma concentración tienen la misma fuerza iónica. Estos resultados demostraron que es necesaria una menor concentración de CaAc_2 que de CaCl_2 para alcanzar la máxima asociación en el CMP (5,6 nm, hexámeros).

Tabla 1.5. Comparación del $d(H)$ y ancho del primer y predominante pico para soluciones de CMP al 5 % (p/p) y distintas concentraciones de CaCl_2 y CaAc_2 .

CaCl₂			CaAc₂	
Concentración de sal	$d(H)$ máx. del primer pico (nm)	Ancho del primer pico (nm)	$d(H)$ máx. del primer pico (nm)	Ancho del primer pico (nm)
0 mM	2,3	1,1 – 6,5	2,3	1,1 – 6,5
10 mM	3,6	1,7 – 7,5	3,6	2,0 – 8,7
40 mM	4,8	2,3 – 10,1	5,6	2,7 – 11,7
60 mM	4,8 – 5,6	2,7 – 11,7	5,6	2,7 – 11,7
100 mM	–	–	5,6	2,7 – 11,7
200 mM	5,6	2,7 – 11,7	–	–

Los espectros FTIR de CMP/ CaCl_2 confirmaron que en presencia de calcio iónico se evidencia principalmente un corrimiento en la posición de los grupos carboxilatos (COO^-) que indicarían interacción para una relación de **1,2 mmoles de Ca^{2+} /g CMP** o superior. Sin embargo, en presencia de CaAc_2 , los espectros FTIR del CMP no mostraron los corrimientos esperados, confirmando que es la especie CaAc^+ la que interacciona principalmente con el CMP. Estos hallazgos a nivel molecular explicarían las diferencias en los ensayos macroscópicos realizados en la Sección I.

Conclusiones generales del Capítulo 1

Los resultados antes expuestos permitieron evidenciar a nivel macroscópico y molecular, respectivamente, la interacción entre el CMP y el calcio proveniente de dos fuentes con aniones diferentes: CaCl_2 y CaAc_2 . La presencia de ambas sales provocó modificaciones en el comportamiento de flujo, el color, la asociación molecular y en los espectros FTIR del CMP.

En ausencia de sales, la forma predominante del CMP a pH 7,0 es la monomérica, y ante la adición de 60 mM de CaCl_2 o 40 mM de CaAc_2 se alcanzó un estado de asociación máximo en el cual las moléculas se asociaron en forma de hexámeros. Este cambio en el tamaño es indicativo de una interacción molecular con ambas sales. Estas estructuras se alcanzaron con una relación de 0,8 (para el CaAc_2) y 1,2 milimoles de sal/g de CMP (para el CaCl_2). Evidentemente, el mecanismo de interacción y la especie con la cual el CMP interacciona es diferente en cada caso.

Se concluye entonces que ambas sales estudiadas servirían como nueva estrategia de fortificación con calcio, sin embargo, hay algunas consideraciones que se deberían tener en cuenta: las soluciones de CMP admitieron la incorporación de grandes cantidades de CaCl_2 , lo que indicaría que puede ser una excelente alternativa para aumentar la biodisponibilidad de calcio, pero las soluciones se vuelven turbias con el tiempo de almacenamiento. Por otro lado, la adición de CaAc_2 aumenta la interacción péptido-péptido, resultando en un aumento de la viscosidad y posterior gelificación de las soluciones.

Referencias

- Abraham, J. P., Sajan, D., Joe, I. H. y Jayakumar, V. S. (2008). "Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of p-amino acetanilide." *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **71**(2): 355-367.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E. y Pilosof, A. M. R. (2012). "Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality." *Journal of Food Engineering* **108**(3): 463-472.
- Burgardt, V. C. F., Oliveira, D. F., Evseev, I. G., Coelho, A. R., Haminiuk, C. W. I. y Waszczynskyj, N. (2014). "Influence of concentration and pH in caseinomacropeptide and carboxymethylcellulose interaction." *Food Hydrocolloids* **35**: 170-180.
- Carmona, P. y Rodríguez, M. L. (1986). "Hydrogen bonding between phosphate and amino acid side chains." *Journal of Molecular Structure* **143**: 365-368.
- Carr, A. J. y Munro, P. A. (2004). "Reversible cold gelation of sodium caseinate solutions with added salt." *Journal of Dairy Research* **71**(1): 126-128.
- Curley, D. K., T.; Unrah, J.; Farrell, H. (1998). "Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: effects of calcium and temperature." *J. Dairy Sci.* **81**: 3154-3162.
- Choi, D. W., Lee, J. H., Chun, H. H., & Song, K. B (2012). "Isolation of a calcium-binding peptide from bovine serum protein hydrolysates." *Food Science and Biotechnology* **21**(6): 1663-1667.
- Farias, M. E. (2012). Autoensamblaje del caseinomacropéptido (CMP) y su impacto en la gelificación y espumado. Tesis de doctorado, Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Farías, M. E., Martínez, M. J. y Pilosof, A. M. R. (2010). "Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation." *International Dairy Journal*. **20**: 79–88.
- Gómez-Arellano, A., Jiménez-Islas, H., Castrejón-González, E. O., Medina-Torres, L., Dendooven, L., & Escamilla-Silva, E. M. (2017). "Rheological behaviour of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein dispersions." *Food and Bioprocess Technology* **106**: 201-208.
- Jackson, M., Choo, L. P., Watson, P. H., Halliday, W. C., & Mantsch, H. H. (1995). "Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues." *Biochimica et Biophysica Acta e Molecular Basis of Disease* **1270**: 1-6.
- Khajehpour, M., Dashnau, J. L. y Vanderkooi, J. M. (2006). "Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins." *Analytical Biochemistry* **348**(1): 40-48.
- Lewis, S. P., Lewis, A. T. y Lewis, P. D. (2013). "Prediction of glycoprotein secondary structure using ATR-FTIR." *Vibrational Spectroscopy* **69**: 21-29.
- Martínez, M. J., Carrera Sánchez, C., Patino, J. M. R. y Pilosof, A. M. R. (2009a). "Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP)." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **71**: 230-237.
- Martínez, M. J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2009b). "Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air-water interface of caseinoglycomacropeptide (GMP) and b-lactoglobulin mixed systems." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **68**(1): 39-47.
- Martínez, M. J., Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2010). "The dynamics of heat gelation of casein glycomacropeptide - b-lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase." *International Dairy Journal* **20**(9): 580-588.
- Martínez, M. J., Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2011). "Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating." *Food Hydrocolloids* **25**(5): 860-867.
- Martínez, M. J., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R. y Pilosof, A. M. R. (2009c). "Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP)." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **71**(2): 230-237.

- Mikkelsen, T., Frøkiær, H., Topp, C., Bonomi, F., Lametti, S., Picariello, G., y col. (2005). "Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in k-Casein." *Journal of Dairy Science* **88**: 4228–4238.
- Mohammadzadeh-Aghdash, H., Dolatabadi, P., Dehghan, V., Panahi-Azary Barzegar, A. (2017). "Multi-spectroscopic and molecular modeling studies of bovine serum albumin interaction with sodium acetate food additive." *Food Chemistry* **228** 265–269.
- Nara, M. a. T., Masaru (2008). "Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communication* **369**: 225-239.
- Peng, Z., Hou, H., Zhang, K.y Li, B. (2017). "Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats." *Food Chemistry* **221**: 373-378.
- Pitkowski, A., Nicolai, T.y Durand, D. (2009). "Stability of caseinate solutions in the presence of calcium." *Food Hydrocolloids* **23**: 1164-1168.
- Pizones Ruiz-Henestrosa V.M., M. M. J., Rodríguez Patino, J.M y Pilosof A.M.R. (2012). "A dynamic light scattering study on the complex assembly of glycinin soy globulin in aqueous solutions. ." *Journal of American oil Chemistry and Society* **89**: 1183-1191.
- Semenova, M. G., Belyakova, L.E., Polikarpov, Y.N., Antipova, A.S. y Dickinson, E. (2009). "Light scattering study of sodium caseinate+dextran sulfate in aqueous solution: Relationship to emulsion stability." *Food Hydrocolloids* **23**: 629–639.
- Tuan, R. S., Scott, W. A., & Cohn, Z. A. (1978). (1987). "Purification and characterization of calcium-binding protein from chick chorioallantoic membrane." *Journal of Biological Chemistry* **253**(4): 1011-1016.
- Twardowski, J.y Anzenbacher, P. (1994). *Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry* / J. Twardowski, P. Anzenbacher ; translation editor, Mary Masson. New York : Warsaw, Ellis Horwood ; Polish Scientific Publishers.
- Wang, X., Gao, A., Chen, Y., Zhang, X., Li, S.y Chen, Y. (2017). "Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization." *Food Chemistry* **229**: 487-494.
- Wu, W., He, L., Liang, Y., Yue, L., Peng, W., Jin, G., y col. (2019). "Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis." *Food Chemistry* **284**: 80-89.

CAPITULO 2

Interacción CMP/calcio a pH 3,5

CAPÍTULO 2

En este Capítulo, el análisis de las interacciones entre el CMP y el calcio se llevó a cabo en condiciones ácidas (pH 3,5). En estas condiciones, el CMP se autoensambla con el tiempo por la reducción de la repulsión electrostática y finalmente gelifica a temperatura ambiente. Entender el efecto de las sales en la gelificación del CMP no solamente servirá para evaluar su capacidad ligante de calcio e interpretar como interacciona con los iones en estas condiciones sino también permitirá desarrollar, en el futuro, formulaciones que permitan mejorar la funcionalidad de los suplementos dietarios de sales de calcio. En este capítulo, se utilizó una concentración de CMP del 12% (p/p) como en trabajos previos (Martínez y col., 2010; Farías y Pilosof, 2016) con el objeto de acelerar los tiempos de gelificación y obtener los resultados de los experimentos en un plazo de tiempo corto. Sin embargo, la gelificación del CMP a bajas concentraciones tiene otra aplicación práctica. El CMP es una proteína ideal para la nanoencapsulación, tanto sólo o en combinación con otras proteínas. Recientemente, Bourbon y col. (2020) realizaron nanohidrogeles de CMP y lactoferrina, una proteína láctea catiónica transportadora de hierro. La nanoencapsulación o el desarrollo de sistemas de entrega a nanoescala para compuestos bioactivos presenta interés por sus funcionalidades exclusivas, es decir, alta eficiencia de encapsulación y capacidad de carga, la mejora de la biodisponibilidad y estabilidad, además de un perfil de liberación sostenida y el enmascaramiento de sabores indeseables (Gonçalves y col., 2018).

El objetivo de este capítulo fue explorar la interacción entre el CMP y las sales de calcio (CaCl_2 y CaAc_2) a través de la dinámica de gelificación inducida por calentamiento a pH 3,5. Se evaluó la textura, el color y las características reológicas de los geles formados, tanto a temperatura ambiente como por calentamiento, y para interpretar como afecta este pH (3,5) a las interacciones entre el CMP y el calcio, se analizaron los correspondientes espectros FTIR.

1. Gelificación del CMP a pH 3,5 en presencia de CaCl_2 o CaAc_2

Como se ha mencionado anteriormente, el CMP constituye la porción hidrofílica C-terminal de la κ -caseína y contiene todas las modificaciones postraduccionales (glicosilación y fosforilación) presentes en ella (Mikkelsen y col., 2005). Es por ello que el CMP se presenta naturalmente como una mezcla heterogénea de dos fracciones principales: glicosilado (gCMP), y no glicosilado (aCMP) (Kreuz y col., 2009). Se han identificado catorce formas glicosiladas para el CMP (Mollé y Léonil, 1995), el carbohidrato más abundante es el ácido N-acetilneuroamínico (ácido siálico) (Coolbear y col., 1996), el cual tiene un valor de pKa de 2,2. Debido a su heterogeneidad, no tiene un único punto isoeléctrico (pI). Kreuz y col. (2009) determinaron que el pI del aCMP es cercano a 4,15, que se relaciona con la abundancia de residuos ácidos en su cadena peptídica. En contraste, el pI del gCMP es 3,15, debido a la carga negativa de los residuos glicosilados y en especial del ácido siálico que reducen su carga neta (Kreuz y col., 2009).

En esta Sección se analizará el efecto de la presencia de calcio en la gelificación de soluciones de CMP por calentamiento a pH 3,5. Se ha elegido ese valor de pH porque la fracción aCMP se encuentra con carga neta positiva, mientras que la fracción gCMP posee carga neta negativa. Martínez y col. (2011) demostraron que el CMP se autoensambla a temperatura ambiente a valores de pH inferiores a 4,5. Estas estructuras autoensambladas conducen, con el tiempo, a la formación de geles opacos dependiendo de los tiempos de gelificación de la concentración de CMP. A concentraciones tan bajas como 3% (p/p), a pH 3,0 o 3,5 los tiempos necesarios para la gelificación son tan largos como 6-15 días, pero para concentraciones superiores a 7-8% (p/p), el tiempo se acorta (<50 h) (Farías y col., 2010). En este capítulo se ha elegido una concentración de 12% (p/p) para aumentar la velocidad de gelificación como en Martínez y col. (2011).

Otro factor que afecta drásticamente a la velocidad de gelificación del CMP es la temperatura. Calentar desde 25°C hasta 60°C produce un aumento en las velocidades de autoensamblaje y gelificación. Por encima de 60°C ambas velocidades permanecen constantes (Martínez y col., 2010, 2011). Por ello, se realizó un estudio previo (ensayo del “tilting test”) para poder elegir la temperatura óptima de gelificación del CMP en presencia de sales que se utilizó posteriormente en los ensayos de reología.

1.1. Efecto del CaCl_2

1.1.1. Transición sol-gel

Con el propósito de investigar la temperatura óptima para la gelificación de las soluciones de CMP en presencia de CaCl_2 , se determinó el tiempo de transición sol-gel a través del ensayo de “tilting test” según la técnica descrita en la **Sección 2.6**, de **Materiales y Métodos**. Se evaluó el tiempo de gelificación (t_{til}) y la velocidad de gelificación ($V_{\text{til}} = 1/t_{\text{til}}$) de las muestras de CMP 12 % (p/p) con concentraciones variables de CaCl_2 (0 - 250 mM) a diferentes temperaturas (30 - 70 °C).

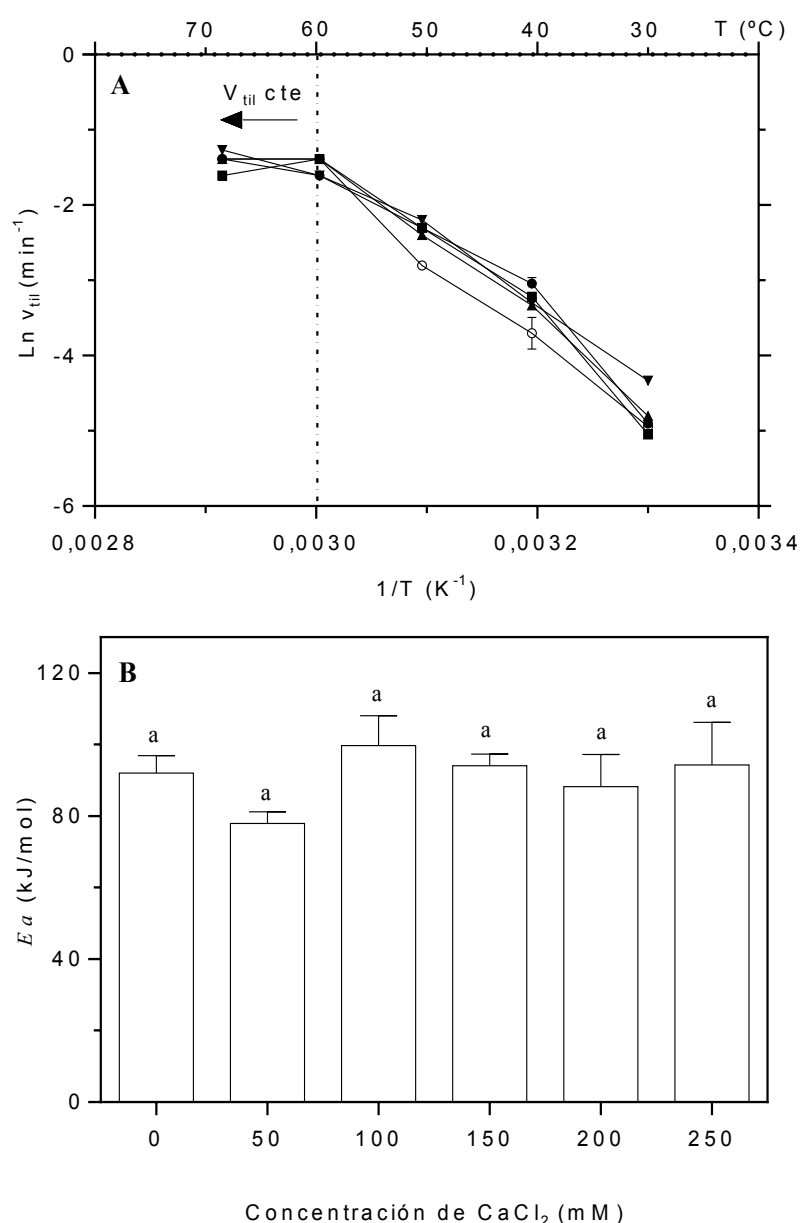


Figura 2.1. A) Gráficos de Arrhenius para las velocidades de gelificación (V_{til}) obtenidas mediante el “tilting test” de soluciones de CMP al 12% (p/p) y diferentes concentraciones de CaCl_2 : (\circ) 0 mM; (\blacktriangledown) 50 mM; (\blacksquare) 100 mM; (\blacktriangle) 150 mM; (\bullet) 200 mM a pH 3,5. **B)** Energía de activación (E_a) en función de la concentración de CaCl_2 . Las barras de error representan el desvío estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

La **Figura 2.1 A** muestra la gráfica de Arrhenius, donde se representa el $\ln V_{ti}$ en función de la inversa de la temperatura absoluta ($1/T$). Las curvas mostraron un comportamiento lineal entre 30 y 60 °C, y un quiebre a partir de esa temperatura. Hasta los 60 °C, V_{ti} dependió sólo de la temperatura independientemente de la cantidad de CaCl_2 presente en la muestra. Por encima de los 60°C, V_{ti} fue constante y tampoco se hallaron diferencias por la presencia de CaCl_2 . Los tiempos de gelificación determinados por esta metodología fueron mayores para las soluciones con CaCl_2 (datos no mostrados).

Se determinaron las energías de activación (E_a) involucradas en la gelificación de los sistemas CMP/ CaCl_2 mediante la ecuación de Arrhenius. La pendiente de las rectas obtenidas multiplicadas por la constante universal R corresponde a la E_a . La **Figura 2.1 B** muestra los valores de la E_a en función de la concentración de CaCl_2 . El valor de E_a promedio determinado en el rango 30 - 60 °C fue 91 ± 8 kJ/mol y no fue afectado por la presencia de CaCl_2 . Farias (2012) encontró un valor más bajo de E_a (65 kJ/mol) para CMP 12 % (p/p) a pH 3,5. Los valores obtenidos de E_a fueron relativamente bajos en comparación con el obtenido con una metodología similar en la gelificación de aislado de proteína de suero (WPI) inducida por acidificación (pH 4,0) con glucano- δ -lactona (155 kJ/mol) o por CaCl_2 (210 kJ/mol) (Kharlamova y col., 2018). Se eligió entonces gelificar a las soluciones a la temperatura de 70 °C, donde V_{ti} fue independiente de la temperatura, de modo de reducir los tiempos de gelificación.

1.1.2. Dinámica de gelificación

La dinámica de gelificación inducida por calor se estudió a través de la reología oscilatoria. El calentamiento se consideró isotérmico (70 °C) dado que el aumento de la temperatura desde 25 °C a 70 °C fue muy rápido (1 min). Luego de 30 min, los geles se enfriaron a la temperatura inicial en 10 minutos. Las **Figuras 2.2** muestra la dinámica de gelificación de soluciones de CMP 12 % (p/p) y concentraciones entre 50 y 250 mM de CaCl_2 a pH 3,5. El cruce de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') indicó el punto de gelificación y a partir del mismo se obtuvo el tiempo de gelificación (t_{gel}) y temperatura de gelificación (70 °C) (Clark, 1992).

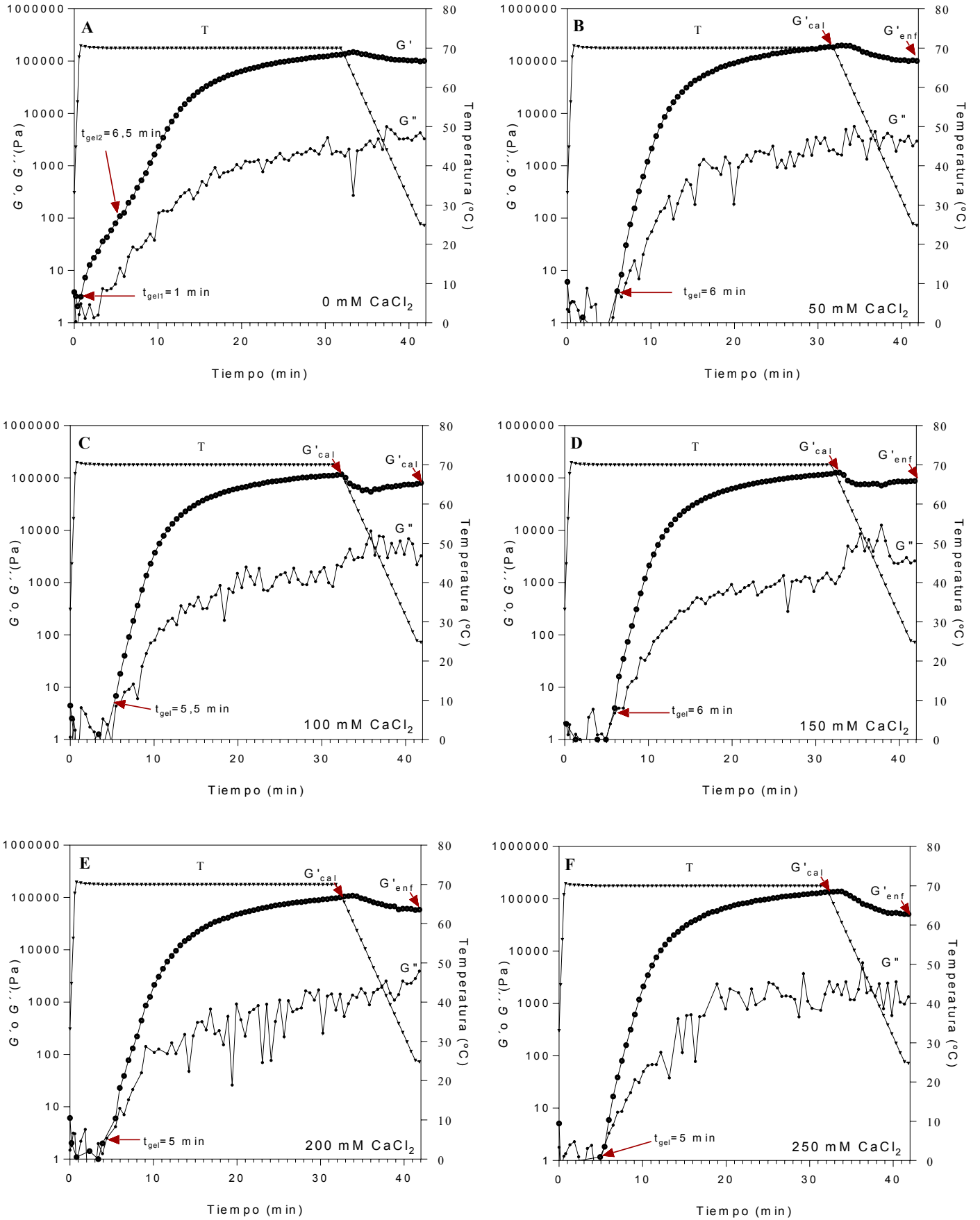


Figura 2.2. Evolución de G' (●) y G'' (■) durante la gelificación de soluciones de CMP 12 % (p/p) y diferentes concentraciones de CaCl_2 (0 - 250 mM) a pH 3,5 y 70 $^{\circ}\text{C}$.

En el reograma del CMP en ausencia de CaCl_2 (**Figura 2.2 A**) se evidenciaron dos puntos de gel ($t_{\text{gel}1} = 1 \text{ min}$ y $t_{\text{gel}2} = 6,5 \text{ min}$) como fue descrito en Martínez y col. (2011) para soluciones de CMP 12 % (p/p) a pH 3,5. Este comportamiento se atribuye a la existencia de dos estructuras que gelificaron a diferentes tiempos. Según el modelo de gelificación (Martínez y col., 2011), el CMP gelifica en dos etapas en ausencia de sales y a pH 3,5. La primera es la formación de dímeros a través de uniones hidrofóbicas y la segunda, es la formación de una estructura de gel a través de interacciones electrostáticas. A pH 3,5, la fracción no glicosilada del CMP (aCMP) está protonada ($\text{pI} = 4,15$) (Kreuz y col., 2009), por lo cual los dímeros de aCMP-aCMP tienen carga positiva. En cambio, los dímeros de la fracción glicosilada gCMP-gCMP tienen carga negativa ($\text{pI} = 3,15$) (Kreuz y col., 2009). Una situación intermedia se da para los dímeros aCMP-gCMP. Por lo tanto, a pH 3,5 coexisten dímeros cargados positivamente que contienen aCMP y dímeros cargados negativamente que contienen gCMP que interactúan electrostáticamente. La existencia de dos puntos de gel en los reogramas del CMP a pH 3,5 se explicaría por los posibles estados isoelectricos de los dímeros (Martínez y col., 2011).

En presencia de CaCl_2 (**Figuras 2.2 B a F**), se puede observar en todos los casos un solo punto de gel (t_{gel}) a $5,4 \pm 0,5 \text{ min}$ que no fue afectado por la concentración de CaCl_2 y estuvieron en el orden $t_{\text{gel}2}$ para el CMP en ausencia de CaCl_2 (**Figura 2.2 A**). Por consiguiente, la presencia de CaCl_2 (aún a baja concentración) afectó principalmente a las estructuras que gelificaban primero y determinaban el $t_{\text{gel}1}$. Los valores de t_{gel} hallados por esta metodología estuvieron en el orden de los encontrados por la técnica del tilting test, aunque en este último caso fueron mayores porque el ensayo del “tilting” requiere de una estructura que soporte el gel (Baeza y col., 2001).

Luego del t_{gel} , los valores de G' siempre fueron superiores a los de G'' . El valor de G' máximo alcanzado durante el período de calentamiento fue denominado G'_{cal} y el G' obtenido al final del enfriamiento G'_{enf} . La **Figura 2.2 A** muestra que G'_{cal} y G'_{enf} son similares en la gelificación del CMP a fuerza iónica nula (ausencia de sal), como fue reportado en Martínez y col. (2011), a diferencia de lo que ocurre típicamente en la mayoría de los geles de proteínas globulares como las proteínas del lactosuero y de soja. Para estas proteínas, G'_{enf} aumenta significativamente atribuyendo este efecto a la reducción de la entropía consolidada por fuerzas atractivas (fuerzas de Van der

Waals y puente hidrógeno) (Ould Eleya y Turgeon, 2000). Por otro lado, los reogramas de los sistemas CMP/CaCl₂ muestran claramente que G' disminuyó durante el enfriamiento. Un análisis detallado se realiza en la **Figura 2.3 A** mostrando que G'_{cal} y G'_{enf} discrepan en su valor en presencia de CaCl₂, aún a bajas concentraciones (50 mM), evidenciando que en el enfriamiento disminuyeron ligeramente las interacciones de las estructuras gelificadas.

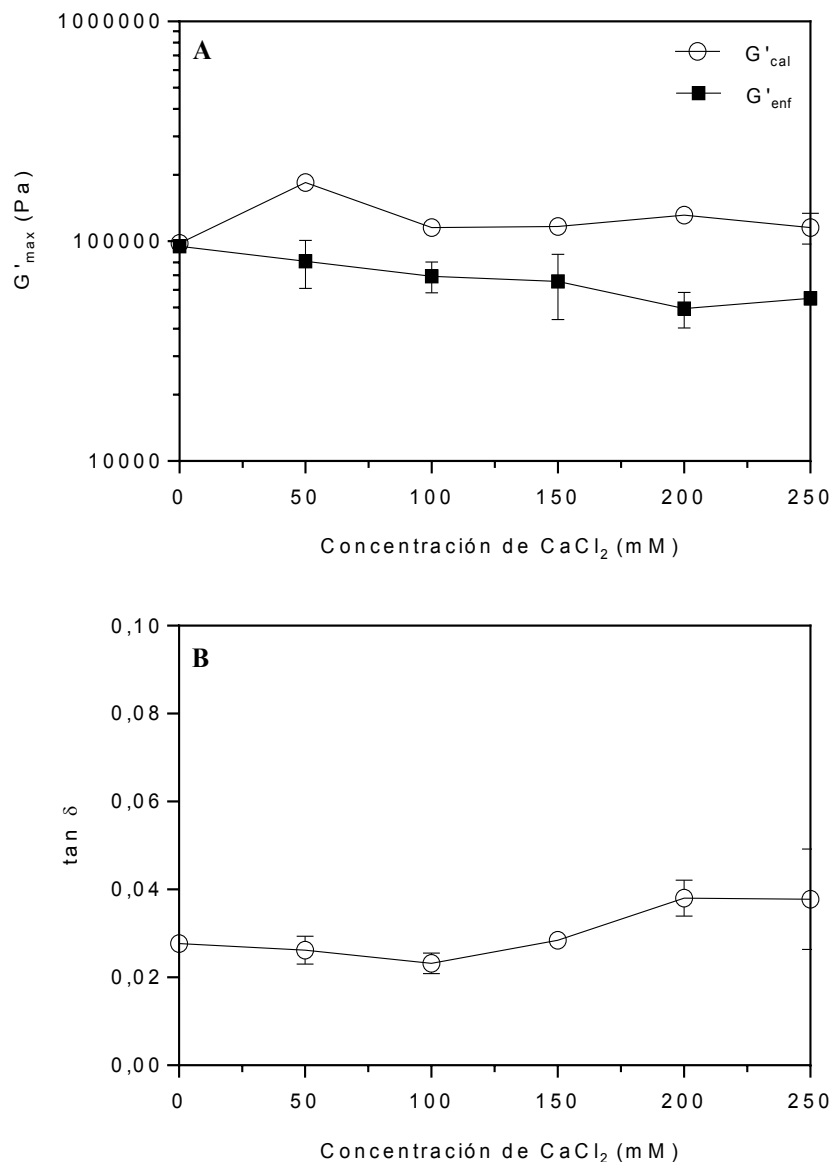


Figura 2.3. A) Evolución de G'_{cal} (\circ) y G'_{enf} (\blacksquare) durante el calentamiento y enfriamiento de geles de CMP 12 % (p/p) y diferentes concentraciones de CaCl₂ (0 - 250 mM) a pH 3,5. **B)** Evolución de $\tan \delta$ de los geles a pH 3,5 y 25 °C.

Si bien G'_{cal} no varió significativamente con la concentración de $CaCl_2$, G'_{enf} presentó una tendencia decreciente (desde 95.000 Pa en ausencia de sal, hasta 55.000 Pa en presencia de 200 y 250 mM de $CaCl_2$).

La tangente del ángulo de fase δ ($\tan \delta$) es un indicador de la organización estructural de un material. Los valores de $\tan \delta$ (G''/G') obtenidos al finalizar el período de enfriamiento (25 °C) fueron similares en todos los sistemas y claramente muy bajos (0,03 – 0,04), sugiriendo un arreglo de red elástica (**Figura 2.3 B**). Por ejemplo, la $\tan \delta$ de la gelatina es 0,03 (Chronakis, 1996). Se puede visualizar que los valores de $\tan \delta$ fueron similares independientemente de la concentración de $CaCl_2$ adicionada al CMP.

En el Capítulo 1, se demostró que el máximo estado de asociación del CMP a pH 7,0 era el hexámero. En cambio, a pH 3,5 no hay diferencias en el estado de asociación sin y con $CaCl_2$, son oligómeros entre 6 y 7 nm con más de 9 unidades de CMP (Farias, 2012). Por el estudio de la dinámica de gelificación presentado aquí, no se pudo reconocer una relación óptima.

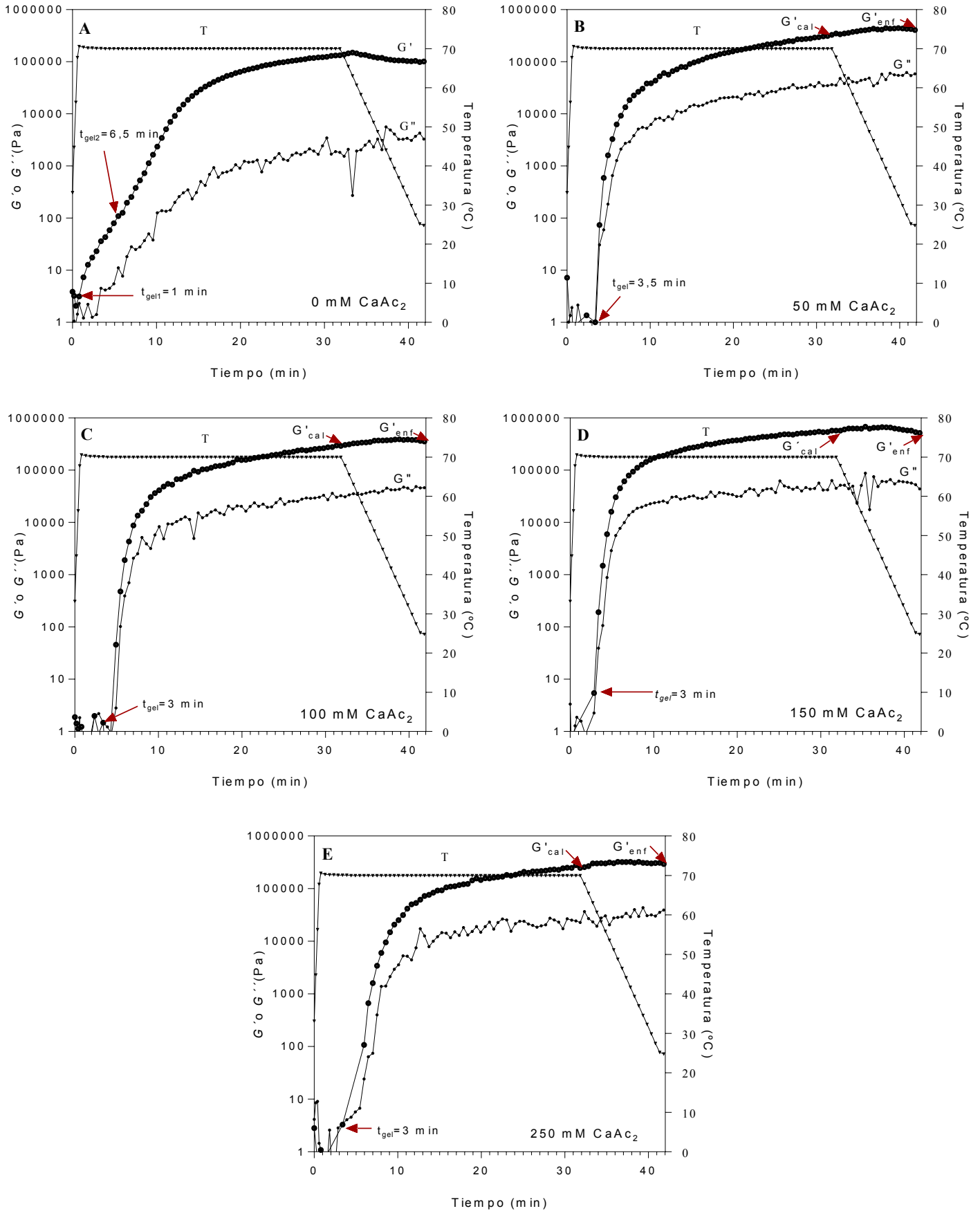


Figura 2.4. Evolución de G' y G'' durante la gelificación de CMP (12 % p/p) y diferentes concentraciones de CaAc_2 (0-250 mM) a pH 3,5 y 70°C.

1.2. Efecto del CaAc_2

1.2.1. Dinámica de gelificación

Los reogramas obtenidos en el estudio de la gelificación del CMP en presencia de CaAc_2 (50; 100; 150 y 250 mM) a pH 3,5 se muestran en la **Figuras 2.4**. En todos los casos se encontró un único punto de gel en aprox. 3 min. Se puede observar que a diferencia de los geles en presencia de CaCl_2 , G' se desarrolló muy rápidamente luego del punto de gel. Aún a bajas concentraciones de CaAc_2 , G'_{enf} superó a G'_{cal} .

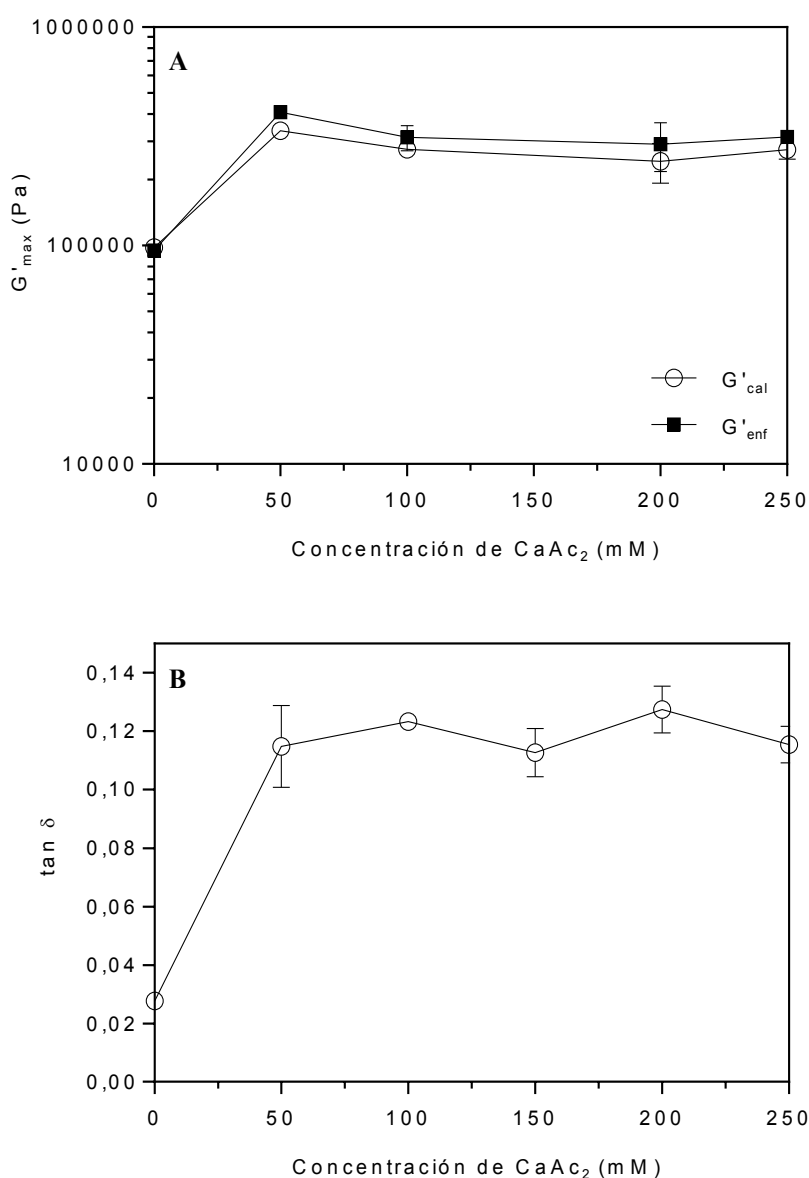


Figura 2.5. A) Evolución de G'_{cal} (\circ) y G'_{enf} (\blacksquare) durante el calentamiento y enfriamiento de geles de CMP 12 % (p/p) y diferentes concentraciones de CaAc_2 (0-250 mM) a pH 3,5
B) Evolución de $\tan \delta$ de los geles a pH 3,5 y 25 °C

Por otro lado, la **Figura 2.5 A** muestra que las diferencias entre G'_{enf} y G'_{cal} no fueron significativas. Pero es de destacar que todos los sistemas con CMP/CaAc₂ presentaron un mayor desarrollo de G' con valores 3 veces superiores a los de CMP a fuerza iónica nula.

La $\tan \delta$ de estos geles fue $0,12 \pm 0,01$ independientemente de la concentración de CaAc₂ y superior a aquella obtenida para el CMP en ausencia de sal (0,03). Un valor de $\tan \delta$ más alto indica que el material responde a la tensión externa en un modo más viscoso y menos elástico. Evidentemente, la presencia de CaAc₂ alteró la estructura del gel de CMP.

1.3. Conclusiones parciales

Se halló una temperatura óptima de gelificación de 70 °C mediante la técnica del “tilting test”. La velocidad de formación del gel de CMP y CaCl₂ dependió de la temperatura hasta 60 °C, más allá de esa temperatura se mantuvo constante independientemente de la concentración de sal agregada.

La dinámica de gelificación del CMP en presencia de CaCl₂ o CaAc₂ a pH 3,5 y 70 °C, mostró que las sales influyeron en todos los parámetros reológicos: el tiempo de gelificación, a los módulos G' y G'' y la $\tan \delta$. Debido a que interaccionan tanto el catión como el anión con los diferentes estados eléctricos de las diversas fracciones del péptido, el efecto de las sales de calcio en la gelificación del CMP es muy complejo.

Los tiempos de gelificación en presencia de CaCl₂ fueron independientes de la concentración y más largos (aprox. 6 min), mientras que, en presencia de CaAc₂ se redujeron a la mitad.

Los geles con CaCl₂ mostraron una disminución de G' durante la etapa de enfriamiento, en cambio los geles con CaAc₂ mostraron un ligero incremento. Evidentemente, el anión acetato consolida las fuerzas atractivas en los geles de CMP, mientras que el anión cloruro las disminuye durante el enfriamiento.

El carácter viscoso de los geles ($\tan \delta$) aumentó en presencia de CaAc₂ pero no fue afectado por la presencia de CaCl₂.

2. Propiedades de los geles de CMP en presencia de CaCl_2 o CaAc_2

La textura, la apariencia y el sabor son los tres componentes principales involucrados en la aceptabilidad de los alimentos. La textura de los alimentos está fuertemente influenciada por la microestructura de los componentes individuales y por la interacción entre ellos (Auty y col., 1999). La resistencia mecánica de los geles está determinada por el número y el tamaño de los agregados que forman parte de su red estructural (Roefs y col., 1990). Una de las maneras de analizar la textura de un gel, es a través de pequeñas deformaciones. El barrido de frecuencia es probablemente la prueba reológica más versátil para caracterizar el comportamiento viscoelástico de los materiales. En esta prueba, se impone una deformación sinusoidal (o tensión) de amplitud fija sobre el material y los módulos dinámicos se determinan en un amplio rango de frecuencias. La trama resultante también se conoce como el "espectro mecánico" del material. La amplitud de deformación debe seleccionarse con cuidado y, en todas las condiciones, debe ser inferior al límite de deformación de la viscoelasticidad lineal, que se determina estudiando el rango viscoelástico lineal. Los reómetros contemporáneos son capaces de medir propiedades dinámicas en una amplia gama de frecuencias, típicamente de 0,01 Hz a 100 Hz. Por estudios previos, es suficiente emplear un rango de 1 - 10 Hz (Farias, 2012).

La textura de los geles también puede estudiarse por grandes deformaciones que simulan la masticación ejercidas por un texturómetro. El texturómetro es una unidad compuesta por una placa sostenida por un brazo flexible que está unido a un medidor de tensión y un émbolo que actúa sobre la muestra (Szczeniak, 1975). Los medidores de tensión detectan la fuerza generada y la registra. La curva generada por el texturómetro es un diagrama de la fuerza en función del tiempo. Esta curva, junto con términos específicos definidos por Szczeniak (1963) se conoce como la técnica de análisis de perfil de textura (TPA) y todavía se usa para muestras de alimentos.

La apariencia es el otro parámetro importante de la aceptabilidad, la determinación del color puede brindar información importante sobre la estructura del gel formado.

En esta Sección se analizará la textura (por pequeñas y altas deformaciones) y el color de los geles de CMP en presencia de CaCl_2 o CaAc_2 .

2.1. Pequeñas deformaciones: barridos de frecuencia

2.1.1. CMP/CaCl₂

Los geles obtenidos a pH 3,5 inducidos por calentamiento a 70 °C se enfriaron a 25 °C y posteriormente fueron evaluados a través de pruebas oscilatorias llamadas barridos de frecuencias, según la técnica descrita en **Sección 2.2 de Materiales y Métodos**.

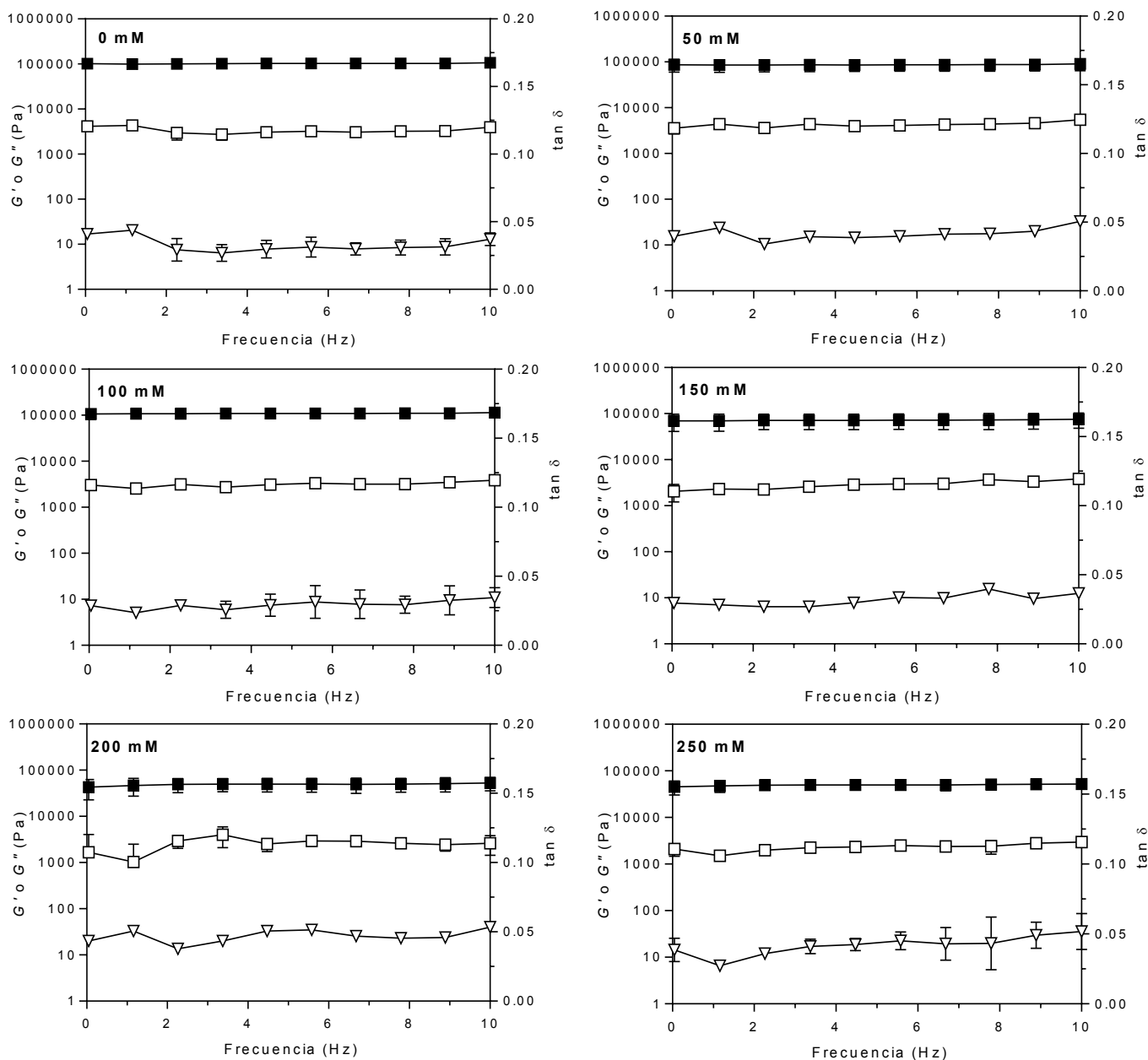


Figura 2.6. Barridos de frecuencia de geles de CMP (12 % p/p) y diferentes concentraciones de CaCl_2 a pH 3,5 y 25 °C. Los geles fueron formados a 70 °C. G' (■), G'' (□) y $\tan \delta$ (▽). Las barras representan el desvío estándar.

La **Figura 2.6 A** muestra el espectro mecánico del CMP en ausencia de sales (0 mM). En el rango de frecuencia analizado, entre 0 y 10 Hz, no se observó dependencia con la frecuencia para ambos módulos (G' y G''). Además, G' fue superior a G'' y la $\tan \delta$ fue cercana a 0,05. Los valores de $\tan \delta$ tendientes a cero se pueden relacionar con un fuerte entrecruzamiento del gel (Di Mattia y col., 2018). Los valores de G' fueron aproximadamente 110.000 Pa para los geles con 0, 50 y 100 mM de CaCl_2 , 76.000 Pa para 150 mM y 56.000 Pa para 200 y 250 mM CaCl_2 . Se encontró una tendencia similar en G'' cuyo valor también disminuyó, desde 4.000 Pa a 3.000 Pa, para 200 y 250 mM de CaCl_2 . La $\tan \delta$ (G''/G') se mantuvo constante independientemente de la concentración de CaCl_2 incorporado al sistema indicando naturaleza de gel fuerte en todos los casos.

Los datos experimentales del barrido de frecuencia (G' y G'') se graficaron según la siguiente ecuación (Di Mattia y col., 2018):

$$G^*_{(f)} = \sqrt{(G''_{(f)})^2 + (G'_{(f)})^2} = A f^{1/z} \quad \text{Ecuación 37}$$

donde G^* = módulo complejo (Pa), f = frecuencia (Hz), z = número de coordinación (adimensional), A = coeficiente de proporcionalidad ($\text{Pa} \cdot \text{s}^{1/z}$).

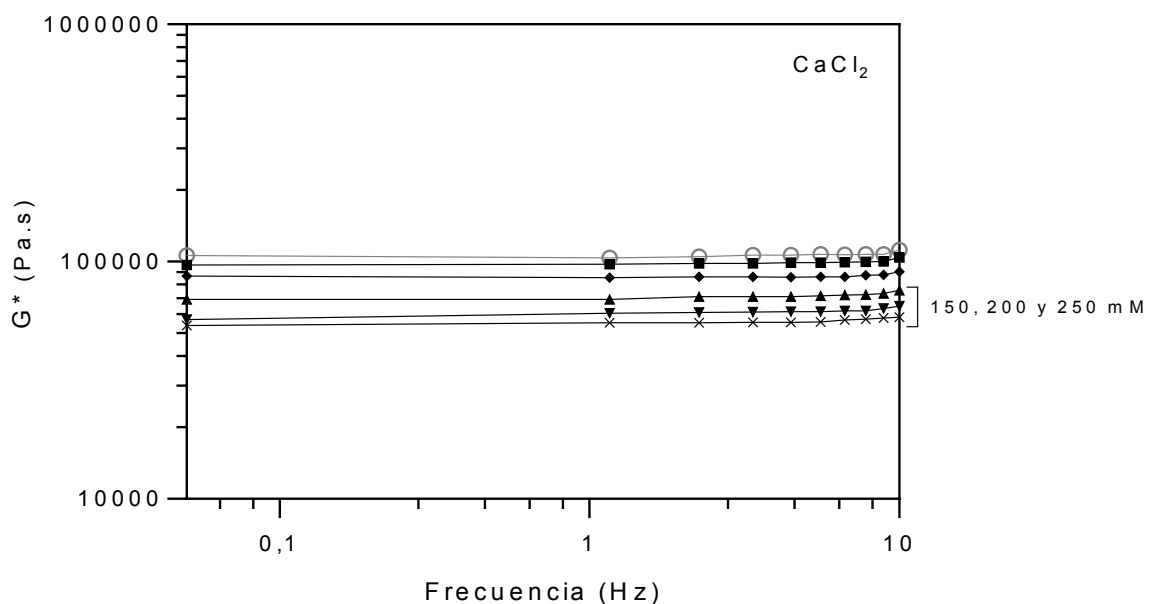


Figura 2.7. G^* en función de la frecuencia de oscilación para geles de CMP y CaCl_2 a pH 3,5 (○) 0 mM; (●) 50 mM; (◆) 100 mM; (■) 150 mM; (▲) 200 mM y (▼) 250 mM ($n=2$ o 3).

El índice z describe la extensión de la red en términos de unidades de flujo y el índice A la fuerza de las interacciones entre estas unidades. En los geles de CMP/ CaCl_2 , el módulo complejo (G^*) fue independiente de la frecuencia de oscilación para todos los sistemas, por lo que se deduce que el índice z fue infinito (**Figura 2.7**). Los valores de A obtenidos fueron muy altos, en el orden de 10^4 - 10^5 Pa, evidenciando una red con mucha interacción molecular. Para los sistemas con 0, 50 y 100 mM de CaCl_2 los valores fueron similares (10^5 Pa). En cambio, G^* disminuyó desde $7,0 \cdot 10^4$ hasta $5,5 \cdot 10^4$ Pa en presencia de CaCl_2 (150-250 mM).

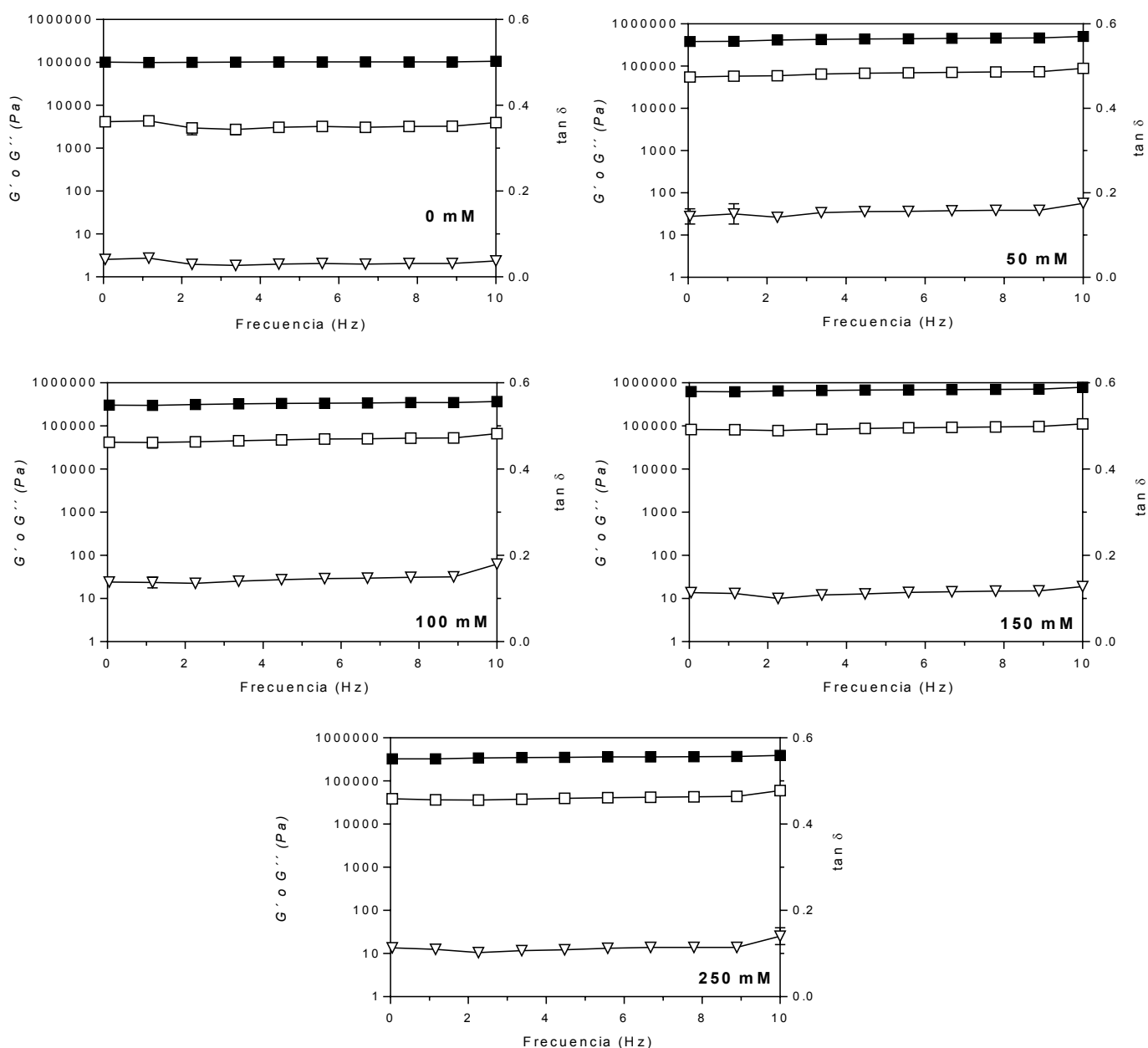


Figura 2.8. Barridos de frecuencia de geles de CMP (12% p/p) y diferentes concentraciones de CaAc_2 a pH 3,5 y 25 °C. Los geles fueron formados a 70 °C. G' (■), G'' (□) y $\tan \delta$ (▽). Las barras representan el desvío estándar ($n=2$).

2.1.2. CMP/CaAc₂

Los barridos de frecuencia de los geles de CMP en presencia de CaAc₂ (**Figura 2.8**) tienen el típico comportamiento de gel, donde G' fue siempre superior a G'' y no se observaron entrecruzamientos en la frecuencia estudiada. Estos resultados indicaron que, bajo condiciones no destructivas, la elasticidad tuvo un efecto predominante. Por otro lado, los valores de $\tan \delta$ fueron cercanos a 0,15, relacionados con el incremento del carácter viscoso del gel (aumento de G'').

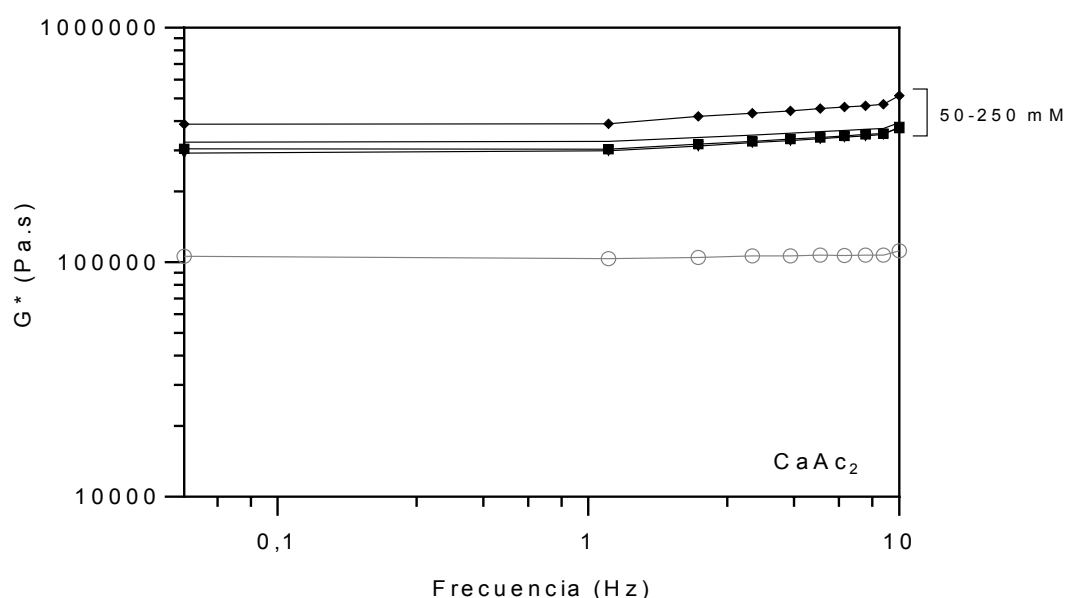


Figura 2.9. Módulo complejo G^* en función de la frecuencia de oscilación para geles de CMP y CaAc₂ a pH 3,5 (○) 0 mM; (●) 50 mM; (◆) 100 mM; (■) 150 mM; y (▼) 250 mM ($n=2$ o 3).

La **Figura 2.9** muestra que G^* fue independiente de la frecuencia de oscilación para los geles de CMP/CaAc₂. El índice A fue marcadamente diferente en presencia de CaAc₂, independientemente de la concentración de sal presente en la muestra y 3 veces superior a los geles de CMP con fi nula. El valor más alto de G^* se debió al mayor aporte de G'' .

2.2. Parámetros del color

Los geles de CMP al 12 % (p/p) en ausencia de sales fueron opacos a pH 3,5 como fue informado en Farías y col. (2016). La medición del color se realizó mediante la técnica descrita en la **Sección 2.4 de Materiales y Métodos**.

En presencia de CaCl_2 o CaAc_2 los geles de CMP al 12 % p/p se tornaron transparentes a partir de concentraciones superiores a 100 mM (**Figura 2.10**). La temperatura de formación de los geles no afectó a su coloración como se informó previamente en Farias (2012) para geles de CMP a pH 2 a 3,5 en condiciones de fuerza iónica nula.

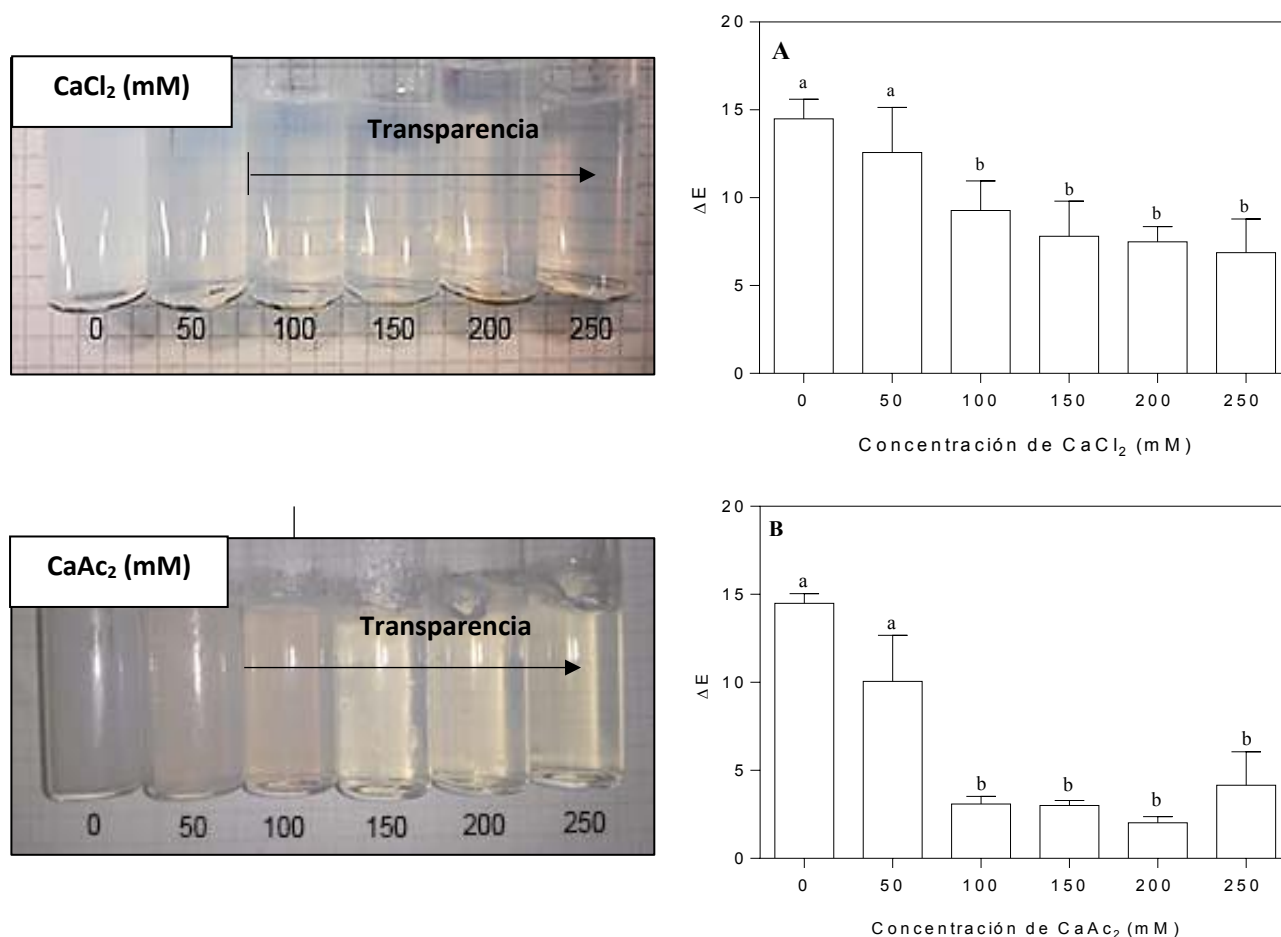


Figura 2.10. Izq.) Imágenes de los geles de CMP 12 % (p/p) y diferentes concentraciones de CaCl_2 o CaAc_2 a pH 3,5, formados a 70 °C y enfriados a 25 °C. Der.) Diferencia de color (ΔE) de los geles de CMP 12% (p/p) antes y después de gelificar a pH 3,5, formados a 25°C, con diferentes concentraciones de: **A)** CaCl_2 , **B)** CaAc_2 .

Para poder medir el color con más practicidad (y luego las propiedades texturales), se decidió gelificar las muestras a temperatura ambiente en recipientes plásticos transparentes. Ninguno de los geles obtenidos fueron desmoldables. En todo momento los recipientes se mantuvieron sellados herméticamente para evitar la evaporación del agua.

La diferencia de color se calculó con la siguiente ecuación (Taktak y col., 2018):

$$\Delta E = [\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación 11}$$

donde, ΔL es la diferencia de luminosidad después y antes de gelificar; Δa es la diferencia de intensidad de color verde/rojo después y antes de gelificar y Δb es la diferencia de intensidad de color azul/amarillo después y antes de gelificar.

Las **Figuras 2.10** muestran el cambio de los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de las muestras de CMP a pH 3,5 antes y después de la gelificación a temperatura ambiente y la apariencia de los geles. La medición del color estuvo en línea con la observación visual. Las muestras de CMP con CaCl_2 o CaAc_2 presentaron resultados menores cambios en los parámetros de color (ΔE) a partir de la concentración de 100 mM o superior. Dado que la concentración de los geles fue de 12 % (p/p), la relación de sal de calcio por gramo de CMP fue 0,8 mmoles calcio/ g CMP, un valor cercano a los obtenidos a pH 7,0 (1,2 mmoles calcio/ g CMP).

Evidentemente, el agregado de las sales de calcio disminuyó el tamaño de los agregados que conforman la microestructura del gel, haciéndolos más transparentes.

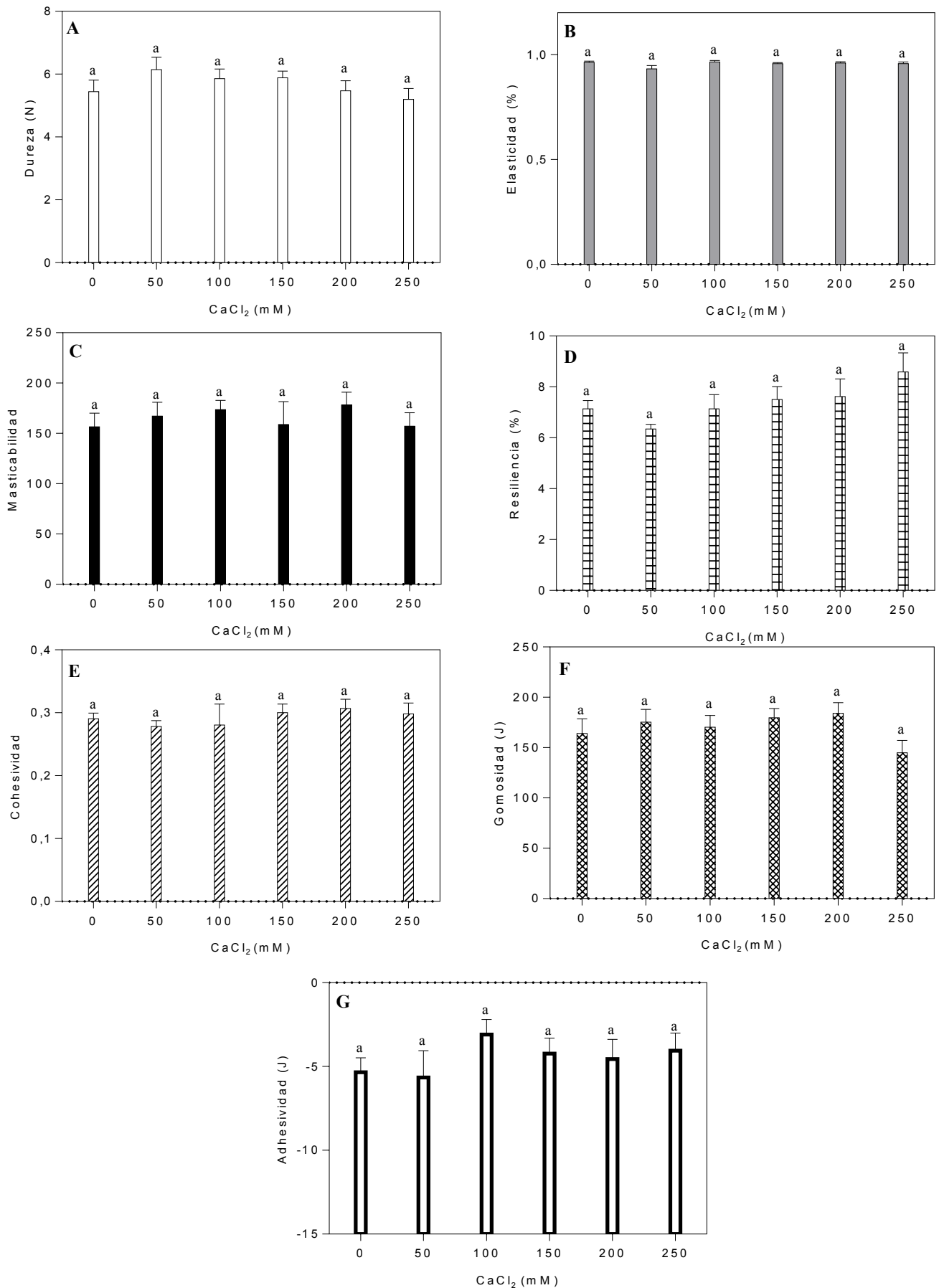


Figura 2.11. Parámetros de textura: **A)** Dureza, **B)** Elasticidad, **C)** Masticabilidad, **D)** Resiliencia, **E)** Cohesividad, **F)** Gomosidad y **G)** Adhesividad de geles de CMP 12 % (p/p) a diferentes concentraciones de CaCl_2 formados a 25 °C y a pH 3,5.

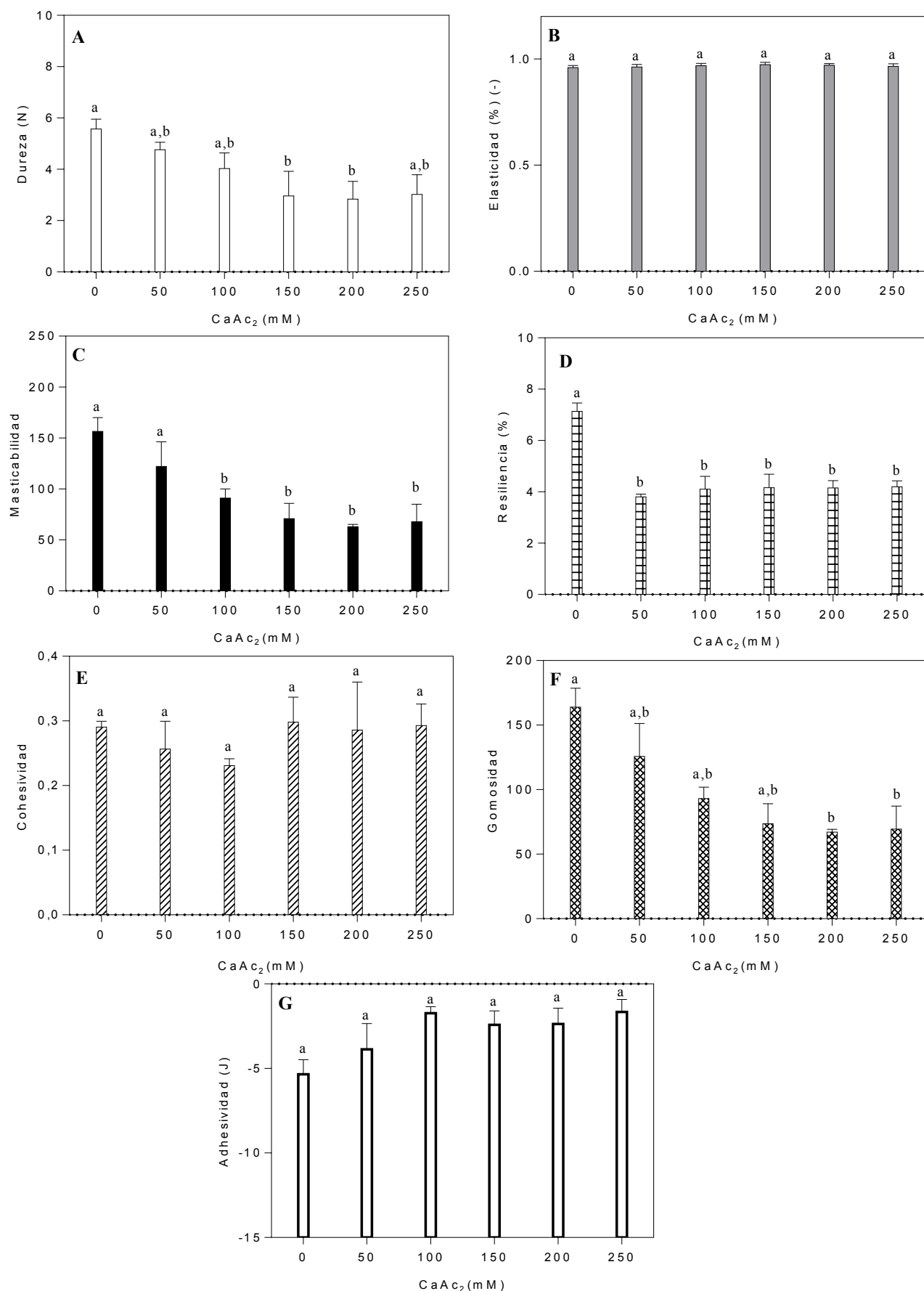


Figura 2.12. Parámetros de textura **A)** Dureza, **B)** Elasticidad, **C)** Masticabilidad, **D)** Resiliencia, **E)** Cohesividad, **F)** Gomosidad y **G)** Adhesividad de geles de CMP 12 % (p/p) a diferentes concentraciones de CaAc_2 formados a 25 °C y a pH 3,5.

2.3. Parámetros de textura

Se analizó la textura de los geles de CMP con las diferentes sales CaCl_2 o CaAc_2 . Los geles utilizados fueron los mismos a los cuales se les midió el color y fueron formados a temperatura ambiente (25 °C). Las propiedades texturales de los geles de CMP no dependen de la temperatura en la que se formaron (Farias, 2012; Farías y col., 2016). Los parámetros texturales obtenidos del ensayo TPA (Texture Profile Analysis) fueron dureza, elasticidad, masticabilidad, resiliencia, cohesión, gomosidad y adhesividad que fueron definidos en la **Sección 2.7 de Materiales y Métodos**.

Las **Figuras 2.11 A** muestran que no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la dureza de los geles de CMP en presencia de CaCl_2 (≈ 6 N). Por otro lado, la dureza de los geles de CMP disminuyó hasta aproximadamente 4 N en presencia de CaAc_2 (**Figuras 2.12**).

La elasticidad denota cómo el gel se recupera luego de ser deformado. Los resultados mostraron que los geles de CMP fueron muy elásticos con un valor muy cercano a 1 %, independientemente del tipo o concentración de sal incorporada al CMP (**Figuras 2.11 y 2.12 B**).

La masticabilidad, que es el producto entre la dureza, la cohesividad y la elasticidad, fue similar para los geles de CMP en presencia de CaCl_2 (**Figuras 2.11 C**). Sin embargo, los geles con CaAc_2 presentaron valores más bajos a concentraciones superiores a 100 mM (**Figuras 2.12 C**).

La resiliencia fue relativamente baja en todos los geles, con valores de 7 – 9 % para los geles de CMP con CaCl_2 (**Figuras 2.11 D**) y valores aún más bajos, (4 – 6 %) con CaAc_2 (**Figuras 2.12 D**).

La cohesividad es la propiedad que mide la recuperación del gel luego de la segunda deformación. Los geles de CMP no presentaron diferencias significativas con la incorporación de CaCl_2 o CaAc_2 y tuvieron un valor de $\approx 0,3$ (**Figuras 2.11 y 2.12 E**).

La gomosidad, que es el producto entre la dureza y la cohesividad, se define como la energía requerida para romper un alimento semisólido antes de tragarlo (Irani y col., 2019). La gomosidad de los geles de CMP fue cercana a 150 a fin nula o en presencia de CaCl_2 (**Figuras 2.11 F**). Sin embargo, este parámetro disminuyó a valores cercanos a 100 en presencia de CaAc_2 (**Figuras 2.23 F y 2.24 F**).

Finalmente, en cuanto a la adhesividad, se observó que todos los geles tuvieron un valor despreciable (**Figuras 2.11 y 2.12 G**).

2.4. Conclusiones parciales

El análisis de la textura de los geles de CMP en presencia de CaCl_2 por pequeñas deformaciones (barridos de frecuencia) mostró que la presencia de esta sal no modificó a los valores de $\tan \delta$ (valores cercanos a cero) evidenciando una estructura de gel fuerte. Por otro lado, en presencia de CaAc_2 , los geles de CMP presentaron un mayor valor de G^* , que contemplan un carácter más viscoso (aumento de $\tan \delta$ y G'').

El análisis de la textura por grandes deformaciones (TPA) mostró que la adición de CaCl_2 no modificó a los parámetros de dureza, elasticidad, masticabilidad, resiliencia, cohesividad, gomosidad y adhesividad. El CaAc_2 presentó un importante impacto en las propiedades texturales de los geles CMP: disminuyó la dureza, la masticabilidad, la resiliencia y la gomosidad. El detrimento de las propiedades texturales podría relacionarse con la presencia de interacciones competitivas con el anión Ac^- , que es altamente hidrofílico.

Finalmente, el análisis del color de los geles arrojó resultados similares al utilizar ambas sales, y su presencia volvió a los geles más transparentes indicando la formación de estructuras más pequeñas.

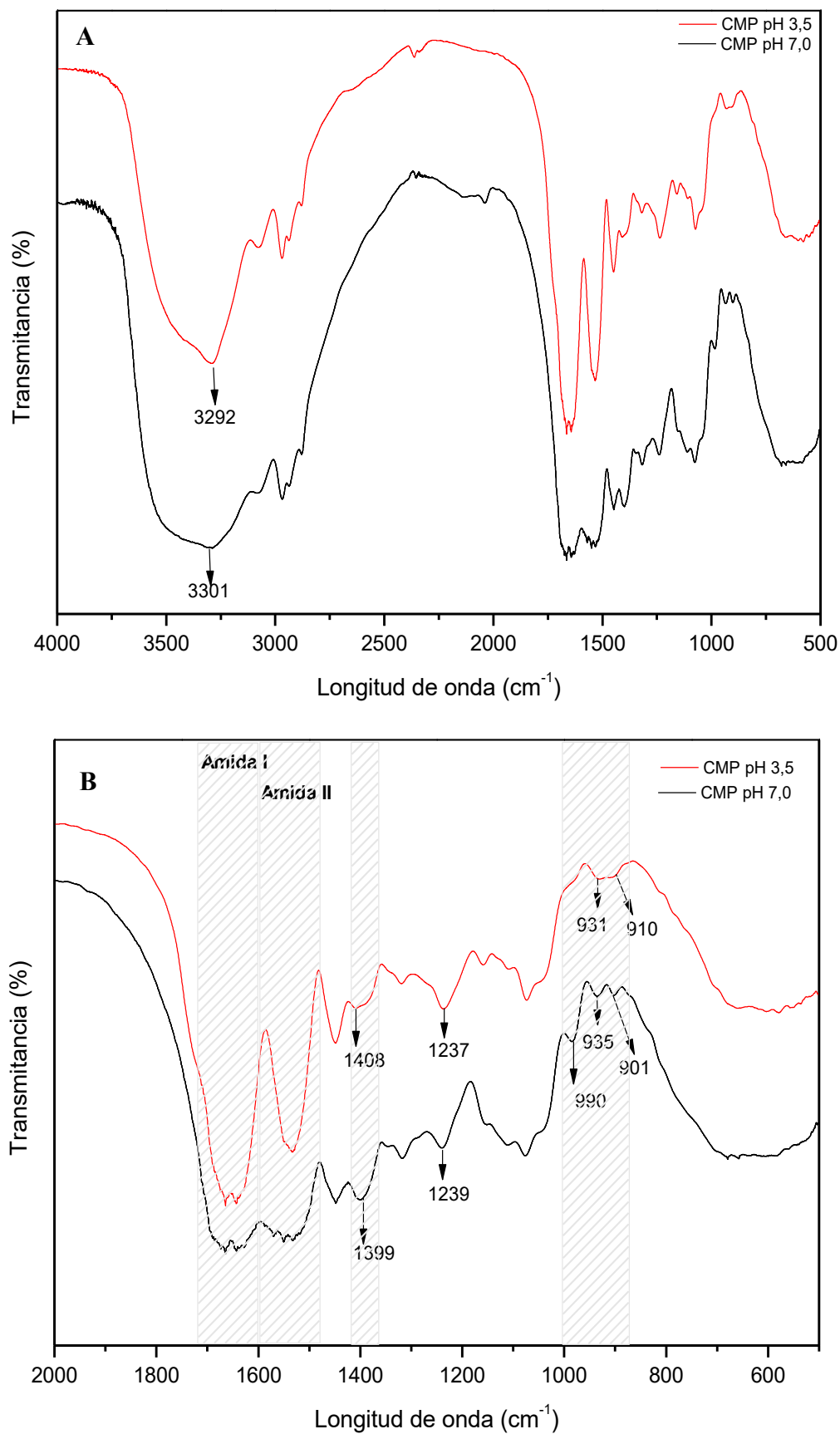


Figura 2.13. Espectro FTIR del CMP a pH 3,5 y 7,0. **A)** espectro completo (4000 a 500 cm^{-1}), **B)** espectro parcial (2000 - 500 cm^{-1}).

3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

3.1. Comparación del espectro FTIR del CMP a pH 3,5 y 7,0

Los espectros FTIR del CMP a pH 3,5 y a pH 7,0 se muestran en la **Figura 2.13**. El pH tiene mucha influencia sobre la carga neta superficial del CMP (Kreuß y col., 2009) y algunos de los grupos funcionales característicos de la molécula se encuentran protonados, como resultado, se descubren pequeñas diferencias al comparar ambos espectros. La banda ancha de alta intensidad de absorción (Amida 2° A) se desplazó desde 3301 cm^{-1} a 3292 cm^{-1} , al disminuir el pH desde 7,0 a 3,5. La zona de vibración ($1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$) correspondiente a la Amida I (tensión del enlace C=O, tensión del enlace C-N y flexión del enlace N-H) mostró un profundo valle y además de otros picos (1643 , 1664 y 1674 cm^{-1}) con respecto a los hallados en el espectro del CMP a pH 7,0 (1649 y 1655 cm^{-1}). La señal de la Amida I es el mejor indicador de la estructura secundaria de una proteína (O'Loughlin y col., 2015). El autoensamblaje y gelificación del CMP a pH 3,5 evidentemente establecería un cierto orden estructural del cual carece el péptido a pH 7,0 con una conformación “random coil”. La región de Amida II (flexión de los enlaces N-H y C-N) también es indicativa de cambios en la estructura secundaria de las proteínas, sin embargo, también es muy sensible a la hidratación (Sow y Yang, 2015).

La señal correspondiente a los grupos COO^- , que en el CMP a pH 7,0 se observó a 1399 cm^{-1} se desplazó a 1408 cm^{-1} a pH 3,5. Un desplazamiento de esta señal fue encontrada por Ustunol y col. (2019) para el ácido glutámico en las asignaciones de las vibraciones de los COO^- a pH 2 (1410 cm^{-1}) en comparación a los pH entre 6 y 9 (1401 cm^{-1}).

En la **Figura 2.13 B** se muestra el espectro ampliado, desde 2000 a 500 cm^{-1} , con el objeto de analizar con mayor detalle las zonas y picos con mayor variación. La zona de la huella digital ($1300-400\text{ cm}^{-1}$), mostró marcados cambios: la desaparición del pico a 901 cm^{-1} y el desplazamiento de las señales de 916 a 910 cm^{-1} y de 935 a 931 cm^{-1} para el CMP a pH 3,5.

La señal correspondiente a la extensión de las vibraciones P-O (990 cm^{-1}) que se observa en el espectro de CMP a pH 7,0 desapareció cuando el pH descendió a 3,5.

Tabla 2.1. Asignación de picos en los espectros FTIR del CMP sin sales y con CaCl₂ a pH 3,5. Se marcan en negrita las discrepancias con respecto al espectro de CMP sin sales.

Región		Longitud de onda CMP (cm ⁻¹)	Longitud de onda 1,2 mmoles CaCl ₂ /CMP (cm ⁻¹)
Grupos Funcionales (4000-1300 cm⁻¹)	Amida 2° A (3300 cm ⁻¹)	3292	3306
	Amida 2° B (3080 cm ⁻¹)	3078	3084
	Amida I (1700-1600 cm ⁻¹)	-	1628
		-	1636
		1643	1642
	Amida II (1600-1500 cm ⁻¹)	1664	1664
		1674	1673
		1534	1533
		-	1539
		-	1548
	Amida III (1240 cm ⁻¹)	1236	1239
	CH ₃ - (2970 cm ⁻¹)	2969	2968
	CH ₃ - (2940 cm ⁻¹)	2936	2938
	CH ₂ - (1450 cm ⁻¹)	1448	1450
	COO ⁻ (1400 cm ⁻¹)	1408	1414
	Aminas CO-N (1320 cm ⁻¹)	1319	1320
Huella digital (1300-400 cm⁻¹)	Residuos glicosilados (1075 cm ⁻¹)	1074	1075
	P-O (990 cm ⁻¹)	-	-
	Picos de baja intensidad (900-935 cm ⁻¹)	910	907
		931	931

3.2. CMP/CaCl₂

El espectro FTIR del CMP y CaCl₂ en la relación 1,2 mmoles de CaCl₂/g CMP se muestra en la **Figura 2.14**. Las asignaciones de los picos en la **Tabla 2.1**. La banda de absorción de Amida 2° A, que en el CMP a pH 3,5 se ubicó a 3292 cm⁻¹, se desplazó a 3306 cm⁻¹ en presencia de CaCl₂ con una señal más intensa y la banda de Amida 2° B desde 3077 cm⁻¹ a 3084 cm⁻¹. En la zona de absorción de la Amida I (1700 - 1600 cm⁻¹) y Amida II (1600 - 1500 cm⁻¹) se observaron nuevos picos a 1628 -1636 cm⁻¹ y 1539 - 1548 cm⁻¹, respectivamente. Interesantemente, estos nuevos picos (1628 y 1636 cm⁻¹), se asignan a una estructura secundaria β-plegada (Sow y col., 2015). Además, en presencia de CaCl₂, la absorbancia de la Amida I decreció, mientras que la de la Amida II se incrementó. Estos cambios estarían asociados al decrecimiento de la estructura “random coil” y el incremento de una estructura más organizada (β-plegada), como fue explicado por Villarreal-Ramirez y col. (2017) para fosfopéptidos obtenidos de la dentina.

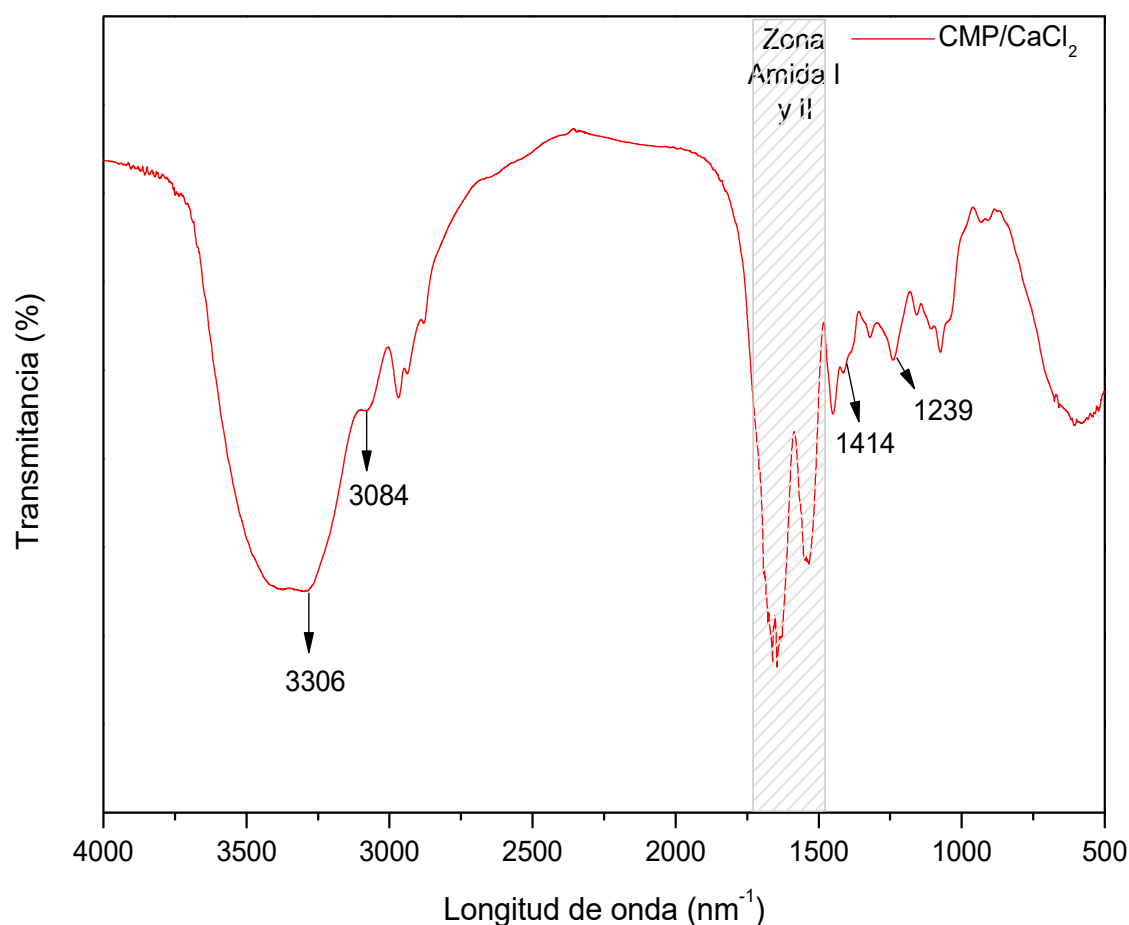


Figura 2.14. Espectro FTIR del CMP en presencia de CaCl₂ en la relación 1,2 mmoles de CaCl₂/g CMP a pH 3,5.

El pico correspondiente a la señal de la Amida III (1236 cm^{-1}) a pH 3,5 se desplazó ligeramente a 1239 cm^{-1} en presencia de CaCl_2 .

El pico a 1408 cm^{-1} , que representa el estiramiento simétrico de los COO^- a pH 3,5, se desplazó a 1414 cm^{-1} en el espectro CMP/ CaCl_2 , sugiriendo que estos grupos interaccionan con calcio iónico a pH 3,5. Además, aparecen dos bandas a 1548 y 1539 cm^{-1} . Byler y Farrell (1989) demostraron que el corrimiento de las bandas a 1410 y 1565 cm^{-1} son indicadoras de una interacción de las proteínas con el calcio iónico.

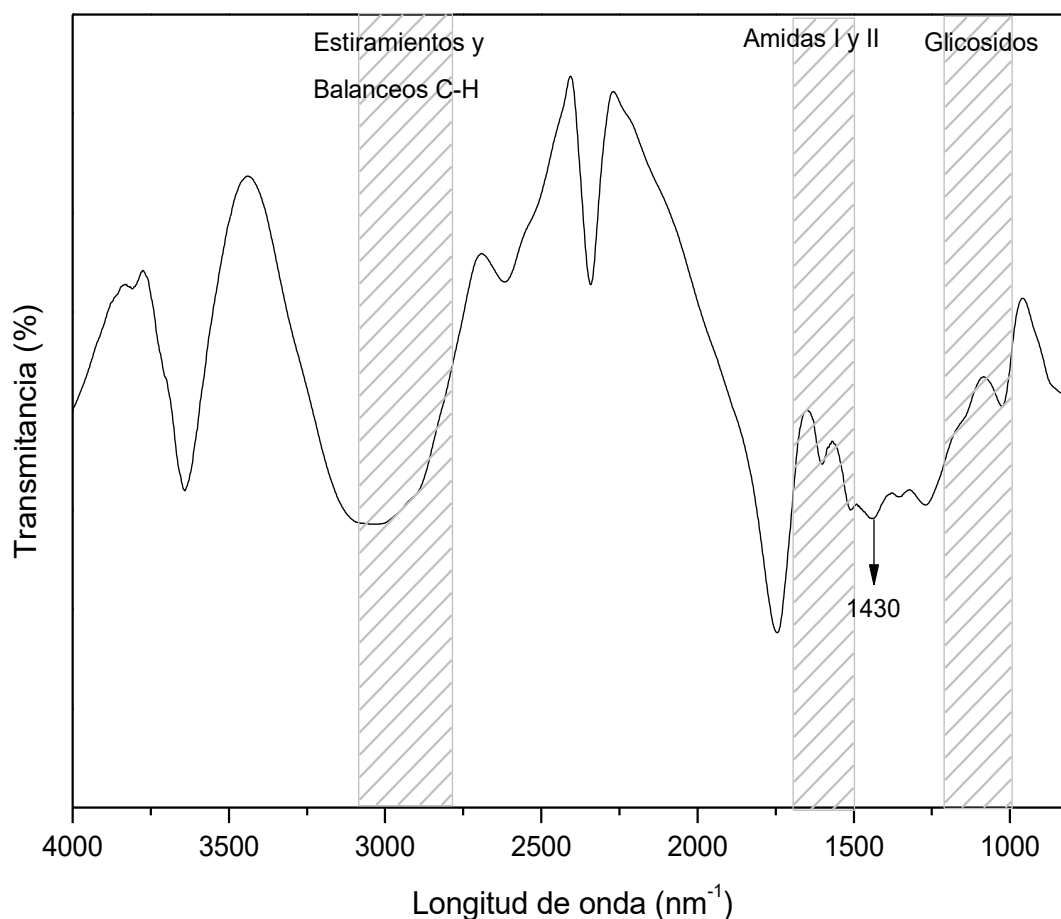


Figura 2.15. Espectro FTIR del CMP en presencia de CaAc_2 (relación 1,2 mM de $\text{CaAc}_2/\text{g CMP}$) a pH 3,5.

3.3. CMP/CaAc₂

La **Figura 2.15** muestra el espectro de CMP con CaAc₂ a pH 3,5. Se encontraron una gran cantidad de señales solapadas entre 3250 y 3000 cm⁻¹ que corresponderían principalmente a estiramientos y balanceos de las uniones C-H. También se observó un solapamiento de muy alta intensidad en la zona de amida I (1700 - 1600 cm⁻¹) y amida II (1600 - 1500 cm⁻¹).

Por otro lado, no se observó señal a 1408 cm⁻¹ (estiramientos simétricos de los COO⁻) y también cambió la zona del espectro en la zona de la huella digital (1300-400 cm⁻¹). Probablemente, los solapamientos observados se deban a las interferencias de los grupos funcionales con el anión acetato. A pH 3,5, las fracciones del CMP tienen cargas opuestas, por lo tanto puede interactuar electrostáticamente tanto el CaAc⁺, el Ca²⁺ como el Ac⁻.

Cabe recordar aquí que la gelificación se realizó ajustando el pH a 3,5 con HCl de alta normalidad, por lo tanto el desplazamiento del Ac⁻ para formar HAc permite la liberación de Ca²⁺. El espectro del CMP en presencia de CaAc₂ es diferente a los observados anteriormente confirmando la naturaleza más compleja de las interacciones.

Conclusiones generales del Capítulo 2

El efecto de las sales en el CMP a pH 3,5 es muy complejo ya que interaccionan tanto el catión como el anión con las diferentes fracciones del péptido que presentan distintos estados eléctricos. El carácter viscoso de los geles aumentó en presencia de acetato, evidenciado por la disminución de la dureza y el aumento de la $\tan \delta$ y el G'').

La transparencia de los geles en presencia de 100 mM de CaCl_2 o CaAc_2 se debería a la formación de unidades estructurales de menor tamaño que interaccionan con el calcio iónico, como lo muestran los espectros FTIR. La relación de saturación sal/CMP encontrada fue 0,83 mmoles/g, ligeramente menor que a pH 7. A pH 3,5, se favorece termodinámicamente la formación de calcio iónico cuando se utiliza CaAc_2 . Asimismo, los cambios observados en los espectros FTIR del CMP en presencia de CaAc_2 y más marcadamente con CaCl_2 , confirmarían una estructura molecular más ordenada. La relación encontrada equivale a 6 moles de Calcio por mol de CMP. Sin embargo, los geles admitieron concentraciones mayores de CaCl_2 o CaAc_2 . Por consiguiente, la formación de geles de CMP y sales de calcio a pH 3,5 podría ser una excelente alternativa para vehiculizar calcio iónico si se utiliza CaAc_2 , para el tratamiento de la hiperfosfatemia.

Referencias

- Auty, M. A. E., Fenelon, M. A., Guinee, T. P., Mullins, C. y Mulvihill, D. M. (1999). "Dynamic confocal scanning laser microscopy methods for studying milk protein gelation and cheese melting." *Scanning* **21**(5): 299-304.
- Baeza, R. I., Gugliotta, L. M. y Pilosof, A. M. R. (2001). "Heat induced aggregation of β -lactoglobulin in the presence of non gelling polysaccharides studied by dynamic light scattering." *Proceedings of EMPROMER 2001* **3**: 1513-1518.
- Bourbon, A. I., Barbosa-Pereira, L., Vicente, A. A., Cerqueira, M. A. y Pastrana, L. (2020). "Dehydration of protein lactoferrin-glycomacropeptide nanohydrogels." *Food Hydrocolloids* **101**: 105550.
- Byler, D. M. y Farrell, H. M. (1989). "Infrared Spectroscopic Evidence for Calcium Ion Interaction with Carboxylate Groups of Casein." *Journal of Dairy Science* **72** (7): 1719-1723.
- Clark, A. H. (1992). *Gels and Gelling. Physical chemistry of foods*. H. G. Hartel, New York: Marcel Dekker: 322-338.
- Coolbear, K. P., Elgar, D. F. y Ayers, J. S. (1996). "Profiling of genetic variants of bovine k-casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques." *International Dairy Journal* **6** (11-12): 1055-1068.
- Chronakis, I. S. (1996). "Network formation and viscoelastic properties of commercial soy protein dispersions: effect of heat treatment, pH and calcium ions." *Food Research International* **29**(2): 123-134.
- Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Neri, L., Giacintucci, V., Cerolini, V., Mastrocola, D., y col. (2018). "Egg yolk gels: Sol-gel transition and mechanical properties as affected by oleuropein enrichment." *Food Hydrocolloids* **84**: 435-440.
- Farias, M. E. (2012). Autoensamblaje del caseinomacropéptido (CMP) y su impacto en la gelificación y espumado. Tesis de doctorado, Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Farías, M. E., Martínez, M. J. y Pilosof, A. M. R. (2010). "Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation." *International Dairy Journal*. **20**: 79-88.
- Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2016). "The influence of acid type on self-assembly, rheological and textural properties of caseinomacropeptide." *International Dairy Journal* **55**: 17-25.
- Gonçalves, R. F. S., Martins, J. T., Duarte, C. M. M., Vicente, A. A. y Pinheiro, A. C. (2018). "Advances in nutraceutical delivery systems: From formulation design for bioavailability enhancement to efficacy and safety evaluation." *Trends in Food Science & Technology* **78**: 270-291.
- Irani, M., Razavi, S. M. A., Abdel-Aal, E.-S. M., Hucl, P. y Patterson, C. A. (2019). "Viscoelastic and textural properties of canary seed starch gels in comparison with wheat starch gel." *International Journal of Biological Macromolecules* **124**: 270-281.
- Kharlamova, A., Chassenieux, C. y Nicolai, T. (2018). "Acid-induced gelation of whey protein aggregates: Kinetics, gel structure and rheological properties." *Food Hydrocolloids* **81**: 263-272.
- Kreuz, M., Strixner, T. y Kulozik, U. (2009). "The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide." *Food Hydrocolloids* **23**(7): 1818-1826.
- Martínez, M. J., Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2010). "The dynamics of heat gelation of casein glycomacropeptide - β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase." *International Dairy Journal* **20**(9): 580-588.
- Martínez, M. J., Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2011). "Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating." *Food Hydrocolloids* **25**(5): 860-867.
- Mikkelsen, T. L., Frøkiær, H., Topp, C., Bonomi, F., Lametti, S., Picariello, G., y col. (2005). "Caseinomacropeptide Self-Association is Dependent on Whether the Peptide is Free or Restricted in κ -Casein." *Journal of Dairy Science* **88**(12): 4228-4238.
- Mollé, D. y Léonil, J. (1995). "Heterogeneity of the bovine k-casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **708**(2): 223-230.

- O'loughlin, I. B., Kelly, P. M., Murray, B. A., Fitzgerald, R. J. y Brodkorb, A. (2015). "Concentrated whey protein ingredients: A Fourier transformed infrared spectroscopy investigation of thermally induced denaturation." *International Journal of Dairy Technology* **68**(3): 349-356.
- Ould Eleya, M. M. y Turgeon, S. L. (2000). "Rheology of k-carrageenan and b-lactoglobulin mixed gels." *Food Hydrocolloids* **14**(1): 29-40.
- Roefs, S. P. F. M., Groot-Mostert, A. E. A. d. y Vliet, T. v. (1990). "Structure of acid casein gels. 1. Formation and model of gel network.".
- Sow, L. C. y Yang, H. (2015). "Effects of salt and sugar addition on the physicochemical properties and nanostructure of fish gelatin." *Food Hydrocolloids* **45**: 72-82.
- Szczesniak, A. S. (1963). " Classification of textural characteristics." *J. Food Sci.* **28**: 385-389.
- Szczesniak, A. S. (1975). "General Foods texture profile revisited - ten years perspective." *J. Texture Stud.* **6**: 5-17.
- Taktak, W., Nasri, R., Hamdi, M., Gomez-Mascaraque, L. G., Lopez-Rubio, A., Li, S., y col. (2018). "Physicochemical, textural, rheological and microstructural properties of protein isolate gels produced from European eel (*Anguilla anguilla*) by heat-induced gelation process." *Food Hydrocolloids* **82**: 278-287.
- Ustunol, I. B., Gonzalez-Pech, N. I. y Grassian, V. H. (2019). "pH-dependent adsorption of α -amino acids, lysine, glutamic acid, serine and glycine, on TiO₂ nanoparticle surfaces." *Journal of Colloid and Interface Science* **554**: 362-375.
- Villarreal-Ramirez, E., Eliezer, D., Garduño-Juarez, R., Gericke, A., Perez-Aguilar, J. M. y Boskey, A. (2017). "Phosphorylation regulates the secondary structure and function of dentin phosphoprotein peptides." *Bone* **95**: 65-75.

CAPITULO 3

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD LIGANTE

CAPITULO 3

El complejamiento del calcio con péptidos y su impacto en la biodisponibilidad de este mineral es un tema muy estudiado, pero con mucha vigencia. Mucho es el esfuerzo invertido por la ciencia para producir, separar, fraccionar y aislar una proteína específica o un péptido. La potencialidad de los péptidos para unir metales está asociada al tipo y secuencia de aminoácidos, su grado de fosforilación y su peso molecular. Sin embargo, la producción a grandes escalas y el uso comercial es muy limitado (Korhonen y Pihlanto, 2006). Los productos lácteos y la leche se han considerado históricamente muy importantes para la salud ósea por su alta biodisponibilidad de calcio (Zhao y col., 2014). Por ejemplo, los caseinofosfopéptidos (CPP) derivados de la digestión intestinal de las caseínas promueven la absorción de calcio e incrementan la calcificación de los huesos en ratas (Jung y col., 2006; Lee y col., 2007; Saito y Kimura, 1998; Sato y col., 1986). La fuerte afinidad con el calcio entre algunos aminoácidos, péptidos y proteínas previenen la disociación y/o la precipitación de las sales de calcio de baja solubilidad durante el proceso de digestión (Tang y Skibsted, 2016). Los péptidos obtenidos de la digestión proteolítica de suero de queso tienen alta capacidad de incorporar iones divalentes como el calcio y el hierro (Zhao y col., 2014). Berrocal y col. (1989) obtuvieron caseinofosfopéptidos (CPP) por hidrólisis del caseinato de sodio y comprobaron su capacidad ligante de calcio a través de la comparación con su análogo desfosforilado (DPP) utilizando un electrodo de ion selectivo de calcio. Los autores hallaron una relación estequiométrica de unión Ca/P 1:1 a pH neutro para los CPP, demostrando que el efecto ligante de calcio dependió principalmente de la presencia de fósforo orgánico.

Algunos aminoácidos son potenciales ligandos del calcio, como los ácidos aspártico y glutámico. Sin embargo, no parece claro si una alta afinidad de un péptido por el calcio no podrá precipitarlo en algunas condiciones y no permitirá su absorción (Tang y col., 2016). El CMP, por su alto contenido de ácido siálico (Nakano y Ozimek, 1999), su cadena peptídica rica en Glu y Asp con una composición aminoacídica única (Thöma-Worringer y col., 2007), su alta carga negativa a pH superior a 4,5, la presencia de Ser fosforilada y su alta solubilidad en presencia de calcio, tiene un alto potencial como ligante de calcio. Además, a diferencia de otros péptidos que deben ser obtenidos por procesos de hidrólisis específicos, se encuentra en abundancia por ser un subproducto de la industria láctea. Actualmente,

la purificación del CMP se realiza a escala industrial por resinas de intercambio iónico y es un producto disponible en el mercado. Además, se ha publicado que la administración oral de CMP en ratas aumentó significativamente el contenido de calcio en el fémur de aquellos animales cuya dieta fue pobre en calcio, especialmente en el período de pleno desarrollo del cuerpo (3 semanas) (Burns y col., 2015).

De nuestro conocimiento, no se dispone en la bibliografía de un análisis preciso y completo de la capacidad ligante de calcio para el CMP. Hasta aquí, se ha demostrado la interacción a través de la espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier, la dispersión dinámica de luz láser (DLS) y la reología (Capítulos 1 y 2). El objetivo de este tercer capítulo fue evaluar la capacidad ligante de calcio del CMP a través de distintas técnicas: DLS, la determinación de la fracción no dializable de calcio (diálisis), la conductimetría, la solubilidad de CaCl_2 en etanol en presencia de CMP, la determinación del calcio unido usando un electrodo de ion selectivo y el cálculo de la constante de asociación a partir de la construcción de isotermas de unión de Ca^{2+} . Es importante destacar que se eligió utilizar CaCl_2 para realizar los ensayos por dos motivos: su disociación completa y su alta solubilidad.

1. Estudio del mecanismo de interacción entre el CMP y el calcio por DLS

A partir de los resultados de la **Sección 2.1 del Capítulo 1** se obtuvo que en la relación 1,2 mmoles de CaCl_2 / g CMP se alcanza el máximo estado de asociación a pH 7, donde las moléculas se asocian en forma de hexámeros. El objetivo de este ensayo fue investigar el efecto de la concentración de CMP en el mecanismo de interacción y comprobar si es afectado por un aumento de la temperatura a 37 °C, que es la temperatura fisiológica del cuerpo humano.

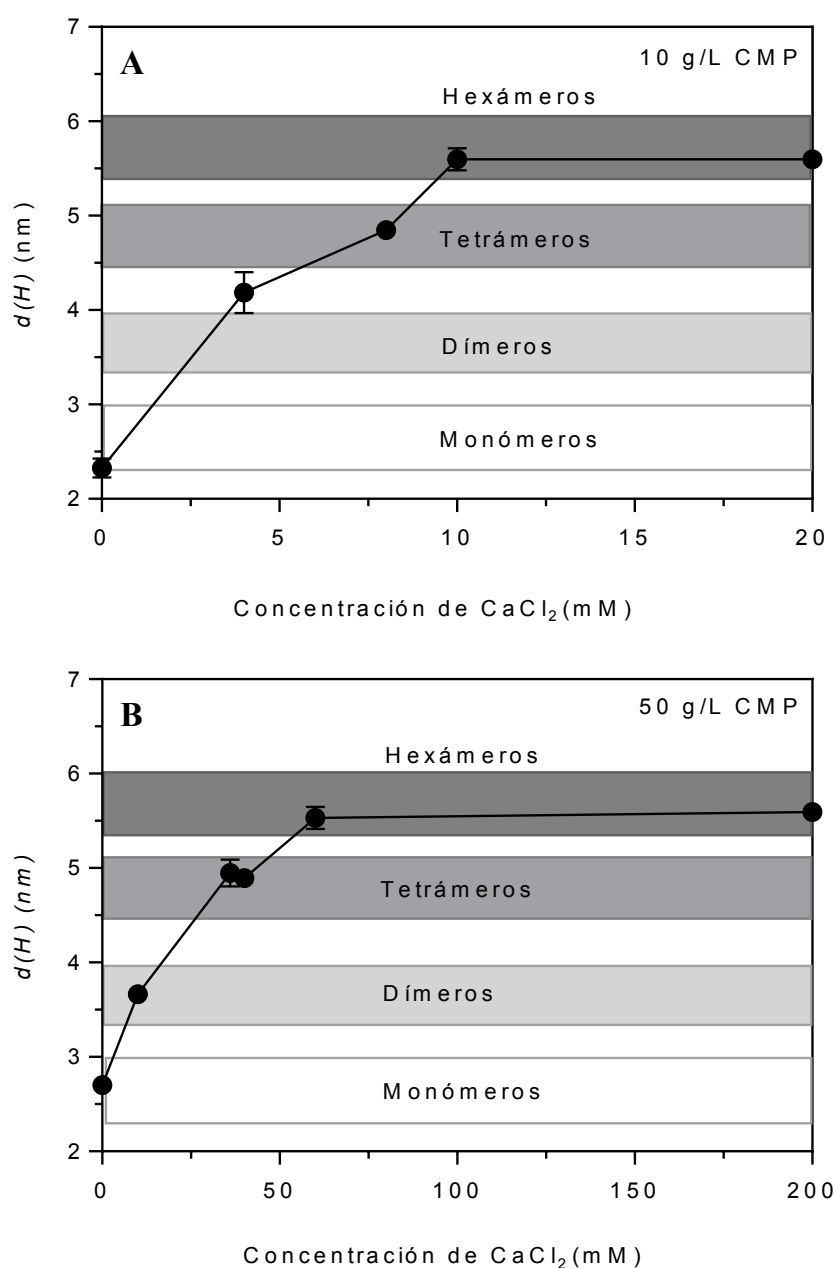


Figura 3.1. Valor máximo del $d(H)$ del primer pico de la distribución (intensidades) de soluciones de CMP en función de concentraciones crecientes de CaCl_2 a pH 7 y 25 °C. Concentración de CMP: **A)** 10 g/L y **B)** 50 g/L. Se indica el estado de asociación predominante estimado mediante el software del equipo Zetasizer Nano-Zs. Las barras representan el desvío estándar.

En primer lugar, se analizó el efecto de la concentración de CMP en el tamaño molecular en presencia de CaCl_2 . En este ensayo se realizaron las mediciones de tamaños de partícula por DLS de dos soluciones de CMP (10 g/L y 50 g/L) con concentraciones variables de CaCl_2 a pH 7,0 y 25 °C. En ausencia de CaCl_2 , las distribuciones fueron bimodales para 10 g/L y trimodales para 50 g/L. Sin embargo, la concentración de CMP no influyó en la posición del primer pico, 2,3-2,5 nm. El software del equipo Zetasizer Nano-Zs permitió estimar el grado de asociación molecular en cada caso sabiendo que la forma monomérica del CMP (aproximadamente 7,5 kDa) presenta un valor de $d(H)$ de 2,6 nm (Farías y col., 2010). La **Figura 3.1** muestra el valor máximo del $d(H)$ del pico predominante y los correspondientes estados de asociación obtenidos en presencia de distintas cantidades de CaCl_2 para ambas soluciones de CMP: 10 g/L (**A**) y 50 g/L (**B**). Para ambos casos, se observó que el $d(H)$ se desplazó hacia tamaños mayores hasta alcanzar un valor máximo (5,6 nm). Es decir, el péptido en presencia de CaCl_2 se autoensambló desde monómeros a dímeros, tetrámeros y finalmente hexámeros dependiendo de la concentración de CaCl_2 presente en el medio.

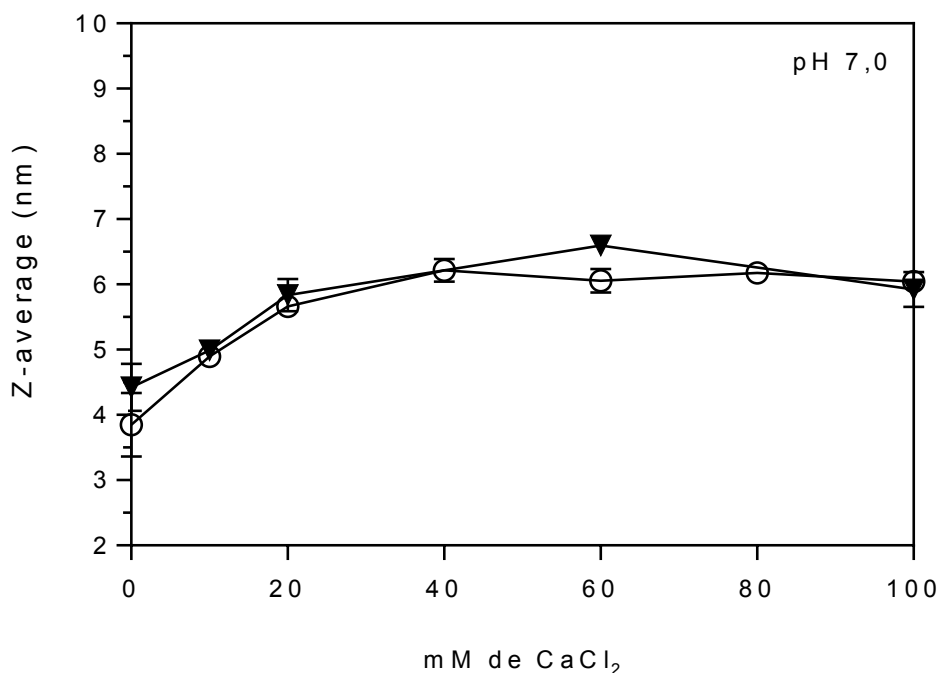


Figura 3.2. Valor de Z-average en función de la concentración de CaCl_2 de soluciones de 10 g/L de CMP a 25 °C (○) y 37 °C (▼) a pH 7. Las barras representan el desvío estándar.

Tanto para las soluciones de 10 g/L como de 50 g/L de CMP, el estado de asociación máximo (hexámeros) se obtuvo para una relación comprendida entre 1 y 1,2 mmoles CaCl_2/g de CMP. Estos resultados confirmaron que el estado de asociación del CMP dependió únicamente de la relación CaCl_2/CMP y no de la concentración del péptido.

Un ensayo similar se realizó a 37 °C con el objeto de estudiar si la asociación molecular entre el CMP y el calcio se ve modificada con la temperatura. Los resultados fueron análogos a los obtenidos para 25 °C, demostrando que las distribuciones de tamaños de partícula no fueron afectadas a 37 °C (datos no mostrados). En la **Figura 3.2** se muestra que el tamaño promedio (Z-average) de las partículas no difirió con la temperatura. En general, la temperatura afecta a las condiciones de equilibrio en las interacciones calcio-péptido (Hou y col., 2018). El CMP parece ser una excepción. A pH superiores a 4,5, la temperatura hasta 85 °C no afecta a las distribuciones de tamaño de partícula del CMP solo (Martinez y col., 2011), aquí se observa el mismo efecto en presencia de calcio.

Basados en nuestros hallazgos, se puede afirmar que la forma de asociación del CMP en presencia de CaCl_2 sigue un mecanismo desde los monómeros hasta los dímeros (0,3 - 0,4 mmoles CaCl_2/g de CMP), luego tetrámeros (0,7 - 0,8 mmoles CaCl_2/g de CMP), y finalmente hexámeros (**1 - 1,2 mmoles CaCl_2/g de CMP** que equivale a **7,5 - 9 mol $\text{CaCl}_2/\text{mol CMP}$**), donde alcanzó su estado de asociación máximo indicando que esta relación es su máxima capacidad ligante.

2. Determinación de la capacidad ligante de calcio del CMP

2.1. Diálisis

El objetivo de esta Sección fue evaluar la capacidad ligante de calcio del CMP por la metodología clásica de cuantificar la fracción no dializable de calcio. Esta fracción es aquella que se encuentra unida al CMP y por ello no puede atravesar la membrana de diálisis. Durante las primeras horas del ensayo, la concentración de calcio dentro de la bolsa de diálisis decreció rápidamente, hasta alcanzar el equilibrio (24 h). El decrecimiento rápido de la fracción de calcio en los primeros momentos se debe a la fácil difusión de los iones a través de la membrana semipermeable, que no puede ser atravesada por el CMP. Los iones calcio difunden debido a la diferencia de potencial químico entre la solución del interior de la bolsa y el agua ultrapura en el exterior.

Dado el impacto de la fuerza iónica en el estado de asociación del CMP, se eligió dializar la muestra contra agua ultrapura a pH 7 y no contra una solución buffer Tris–HCl como se usa en la bibliografía (Bao y col., 2007; Bennick, 1976). La técnica (**Sección 2.8, Materiales y Métodos**) consistió en dializar una solución de 10 g/L de CMP y 20 mM de CaCl_2 , la relación CaCl_2/CMP fue el doble de la óptima hallada en la **Sección 1** de este Capítulo. El calcio no unido al CMP es el que atravesó la membrana de diálisis. En forma paralela se realizó el mismo procedimiento con una solución de CMP a la misma concentración sin calcio adicionado (Blanco). El calcio dentro y fuera de la bolsa de diálisis se determinó por Espectroscopía de Absorción Atómica.

La fracción de calcio que no atravesó la membrana de diálisis (calcio retenido en la bolsa de diálisis junto al CMP) fue del $64,4 \pm 3,3 \%$ y representó el calcio unido al CMP (a pH neutro y temperatura ambiente). Los cálculos se encuentran en el **Anexo I**, al final de este Capítulo. Con los experimentos realizados, se estimó que **$1,3 \pm 0,1$ mmol de Ca^{2+} se encontraron unidos a 1 gramo de CMP** que equivale a **$9,5 \text{ mol } \text{Ca}^{2+}/\text{mol CMP}$** . Estos resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente con la técnica de DLS.

2.2. Conductimetría

La conductividad de una solución está directamente relacionada con la facilidad que tiene una corriente eléctrica para fluir por ella. Cuantos más iones estén libres en una solución, mayor será su conductividad. Las medidas de conductividad se emplearon satisfactoriamente en el monitoreo de la composición de la leche y los cambios en la estabilidad de emulsiones, como así también en la examinación de soluciones proteicas afectadas por las sales (Dybowska, 2011). La determinación de la conductividad de una solución proteica es un método indirecto para detectar cambios conformacionales (Rodríguez Furlán y Campderrós, 2015).

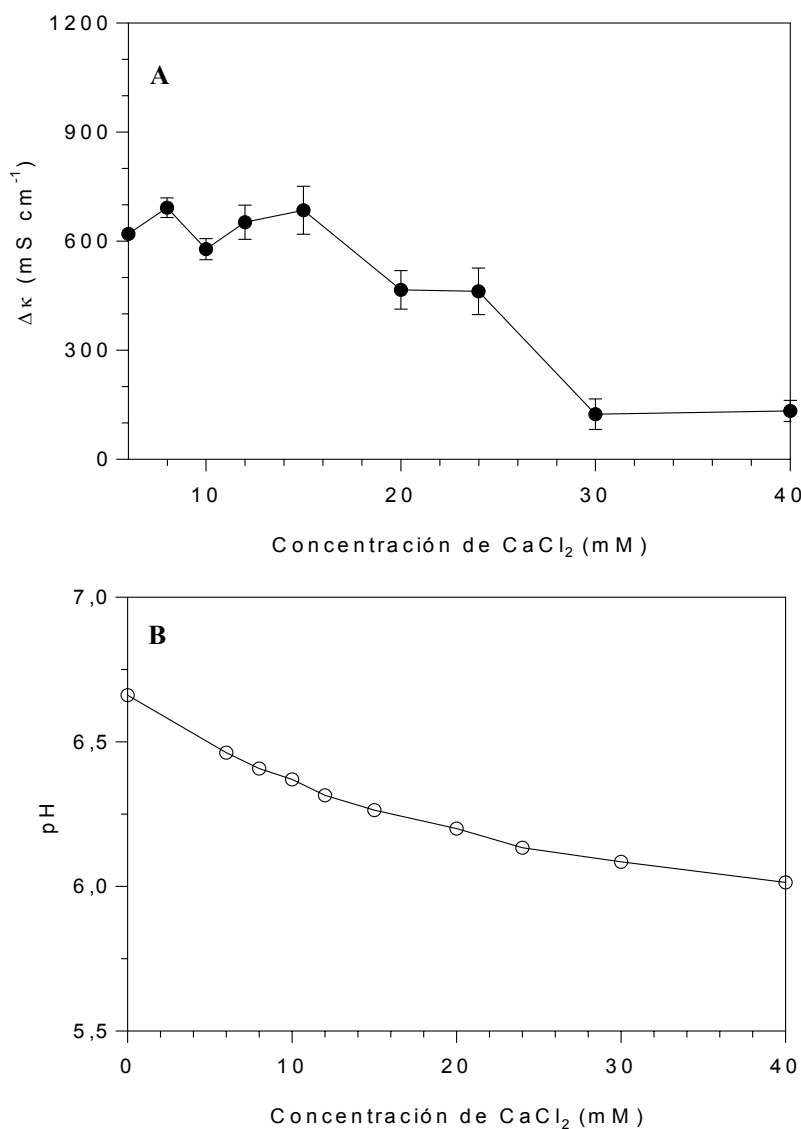


Figura 3.3. A) Evolución de la diferencia en la conductividad ($\Delta\kappa$) entre soluciones de CaCl_2 con 20g/L de CMP y soluciones de CaCl_2 en agua ultrapura a 25 °C.
B) Evolución del pH de las soluciones de CMP y CaCl_2 .
 Las barras representan el desvío estándar.

Se registró la conductividad de soluciones de 20 g/L de CMP y concentraciones variables de CaCl_2 a 25 °C (**Sección 2.10, Materiales y Métodos**). Paralelamente, se midió la conductividad de soluciones de CaCl_2 a la misma concentración. Obviamente, la conductividad de una solución de CMP fue superior a la del agua ultrapura, porque algunos minerales como el calcio, el sodio, el potasio y el fósforo que se encuentran en el suero quedan atrapados durante la etapa de secado del procesamiento del CMP. Estos iones son los que contribuyeron a la conductividad inicial de las soluciones ($1,1 \text{ mS cm}^{-1}$). En presencia de CaCl_2 , las soluciones difirieron en el valor de su conductividad, siendo superiores aquellas con CMP. Cuando la cantidad de calcio agregado fue suficiente para neutralizar el efecto del CMP, los valores de ambas soluciones se aproximaron. La diferencia de conductividad entre ambas soluciones se denominó " $\Delta\kappa$ " como en Valente y col. (2011).

La **Figura 3.3 A** muestra el $\Delta\kappa$ en función de la concentración de CaCl_2 . De su observación, surge que la $\Delta\kappa$ decreció con el aumento de la concentración de CaCl_2 . En general, si se produce una asociación entre una sal y otra molécula, la sal se vuelve menos efectiva como portador de carga y la $\Delta\kappa$ disminuye (Valente y col., 2011). A partir de una concentración de 30 mM de CaCl_2 , el $\Delta\kappa$ alcanzó un mínimo (cercano a cero), indicando que el CMP dejó de tener efecto en la distribución de las cargas. Sabiendo que la interacción entre el CaCl_2 y el CMP sigue una relación estequiométrica por los ensayos antes vistos, en esta técnica el valor encontrado como óptimo fue **1,5 mmol de Ca^{2+} /g de CMP** que equivale a **11 moles Ca^{2+} /mol CMP**.

También, se registró el pH de las soluciones, pero sin ajustarlo para no influir en la fuerza iónica (**Figura 3.3 B**). Se observó un descenso del pH (desde 6,6 a 6,0) que fue similar al obtenido en la en la **Figura 1.7 (Capítulo 1)** para la concentración de 5% de CMP. La variación del pH con el agregado de iones es un indicador de un posible cambio en la conformación de una proteína debido a cambios en la interacción con el medio (Rodríguez Furlán y col., 2015).

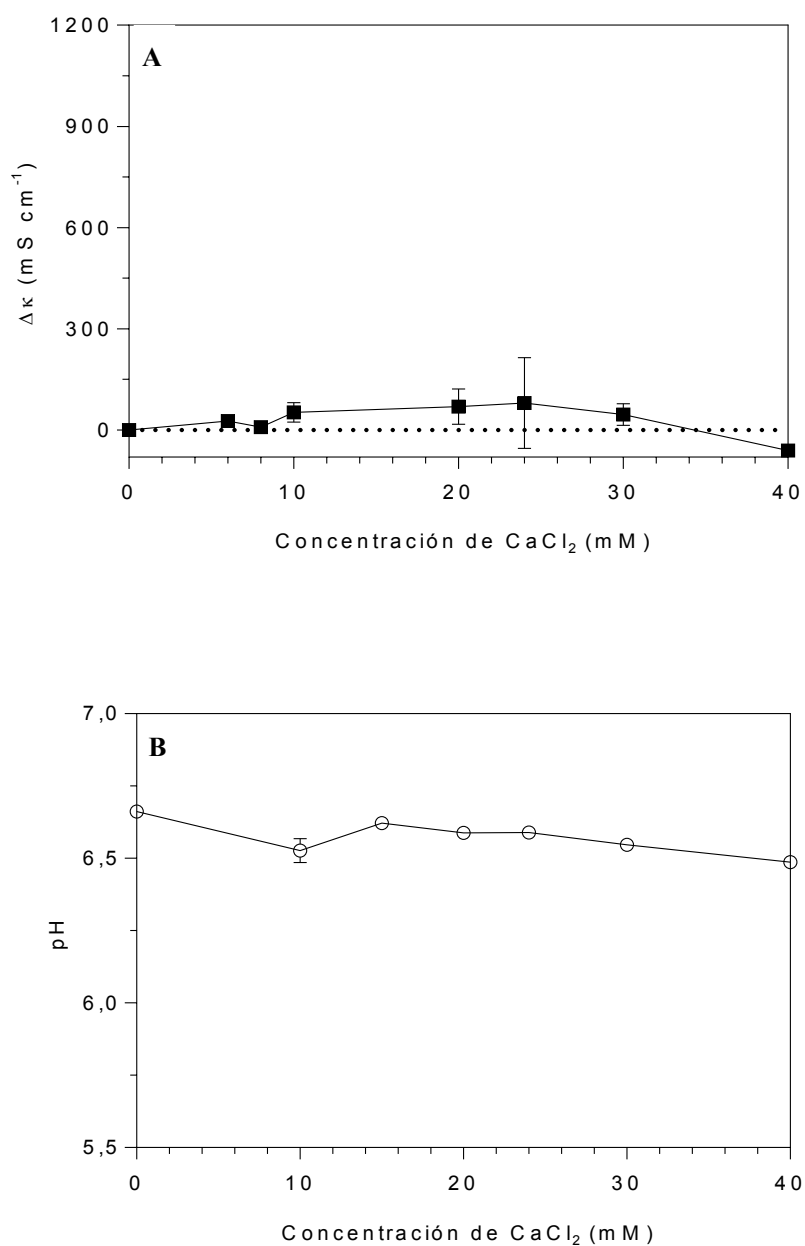


Figura 3.4. A) Evolución de la diferencia en la conductividad ($\Delta\kappa$) entre soluciones de CaCl_2 con 20g/L de β -lg y soluciones de CaCl_2 en agua ultrapura a 25°C.

B) Evolución del pH de las soluciones de β -lg y CaCl_2 .

Las barras representan el desvío estándar.

Para reconocer si el efecto del CMP en la conductividad de las soluciones de CaCl_2 es común a toda proteína, resultó de interés realizar un ensayo similar con β -lactoglobulina (β -lg) que es reconocida por no interaccionar con el CaCl_2 a pH neutro (Carnovale y col., 2015; Damodaran, 2018; Erabit y col., 2013). La β -lg es la proteína mayoritaria del suero de queso.

La diferencia de conductividad ($\Delta\kappa$) entre las soluciones de CaCl_2 en presencia de β -lg y en ausencia de ella se muestra en la **Figura 3.4 A**. En todos los casos el $\Delta\kappa$ fue cero, señalando que la conductividad tanto en presencia como en ausencia de β -lg fue la misma y, por lo tanto, no hubo ningún tipo de interacción con el CaCl_2 . Estos resultados coincidieron con Carnovale y col. (2015) quienes demostraron mediante dicroísmo circular que la conformación de la β -lg no se altera en presencia de CaCl_2 . El pH de las soluciones de β -lg no varió con la concentración de CaCl_2 (**Figura 3.4 B**).

2.3. Solubilidad de CaCl_2 en etanol en presencia de CMP

Otro ensayo interesante para determinar la capacidad de unión del CMP al calcio es a través de la técnica de solubilidad en etanol, la cual se describe en la **Sección 2.14, Materiales y Métodos** y es una adaptación de la utilizada por Zhao y col. (2014). La técnica consiste en colocar CMP y CaCl_2 en exceso de forma tal que se produzca la saturación de todos los sitios posibles de unión del CMP y poder determinar así la capacidad máxima de unión. Posteriormente, se adiciona a la mezcla etanol absoluto con el objeto de precipitar al péptido con calcio unido. En el sobrenadante quedará el exceso de calcio que no reaccionó. En general, esta metodología se usa para aislar un complejo péptido/calcio de un hidrolizado proteico, que luego se separará por cromatografía (Wang y col., 2018; Zong y col., 2012). En este caso, el análisis se limitó a la cuantificación del calcio no unido presente en el sobrenadante mediante titulación con EDTA. Conociendo el calcio total agregado inicialmente y el calcio no unido (soluble en la solución etanólica del sobrenadante y titulado con EDTA) se puede calcular cuánto calcio unido al CMP precipitó a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Ca}_U = \text{Ca}_T - \text{Ca}_S$$

Ecuación 18

donde Ca_T es el calcio total agregado y conocido, Ca_S es el calcio que quedó en exceso en el sobrenadante y determinado por titulación con EDTA y Ca_U el calcio unido al CMP y precipitado juntos, luego de la adición de etanol absoluto.

El contenido de calcio aportado por la muestra de CMP (1,5 g/L) fue sumado al contenido total y fue 0,25 mM de Ca^{2+} .

Este ensayo se realizó dejando fija la concentración de CaCl_2 (8 mM) y variando la concentración de CMP (1; 1,5; 2 y 2,5 g/L). Los resultados de este ensayo se pueden observar en la **Figura 3.5** en donde se grafica la cantidad de calcio unido al CMP (moles de Ca^{2+} /g) en función de la concentración variable de CMP.

La cantidad de calcio unido por g de CMP varió entre **1,2 y 1,7 mmol de Ca^{2+} /g de CMP**, que equivalen a **9 – 12 mol de Ca^{2+} /mol CMP**, valores similares a los obtenidos por las otras técnicas de esta tesis.

Es importante destacar que al incrementar la cantidad de CMP en la muestra más allá de 2 g/L, la cantidad de calcio unido no varió significativamente, indicando que existe una concentración máxima de CMP que puede emplearse en esta técnica.

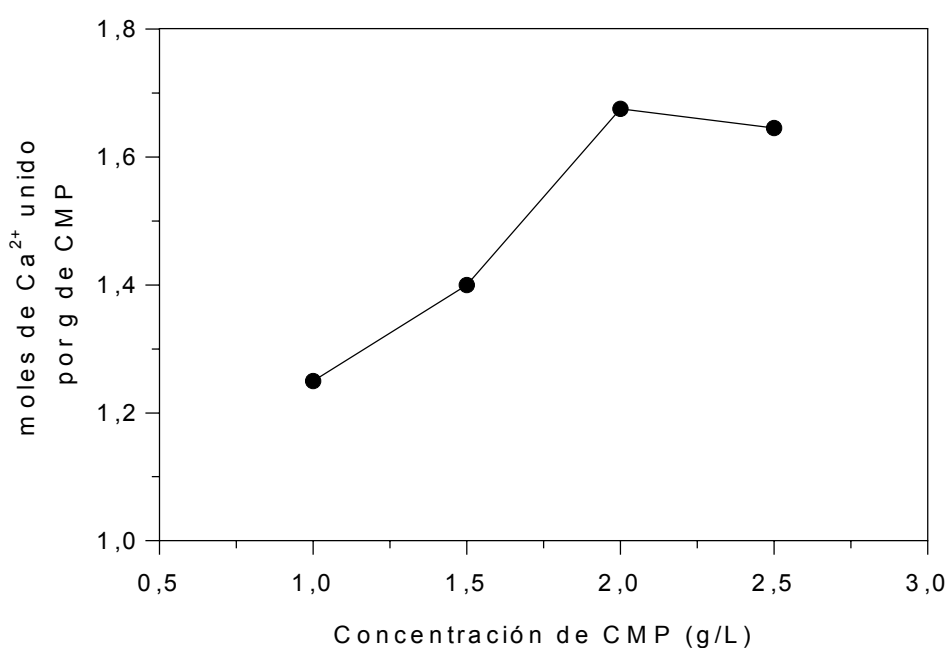


Figura 3.5. Moles de Ca^{2+} unidos por g de CMP en función de la concentración de CMP (g/L) en solución etanólica, a pH 7 y 25 °C.

2.4. Isotermas de unión de Ca^{2+}

La construcción de isotermas de unión de Ca^{2+} a través de una técnica electroquímica es una metodología muy utilizada no solamente para reconocer la cantidad de calcio que se une a una proteína o péptido sino también para calcular su constante de asociación. La metodología es simple, se titula una solución de proteína con una solución de concentración conocida de CaCl_2 (**Sección 2.11, Materiales y Métodos**). Se ha aplicado esta técnica para diferentes proteínas y péptidos desde la década del 70 hasta la actualidad. Son muchos los trabajos recientes que analizaron el calcio ligado de esta manera, por ejemplo, para aminoácidos y péptidos pequeños (Tang y col., 2016); hidrolizados de proteína de Krill antártico (Hou y col., 2018), fosfovitina (Zhang y col., 2016), para proteína de soja (Urbonaite y col., 2015), entre otros.

Después de la adición sucesiva de 50 μL de 200 mM CaCl_2 a 50 mL de una solución de 2 g/L de CMP y 3,5 M KCl se determinó la concentración de calcio libre (Ca_L) con un electrodo de ion selectivo a pH 7, 8 y 9. Para considerar constante el efecto de la fuerza iónica, se incorporó KCl a la solución de CMP a modo de mantenerla constante (Haghtalab y Badizad, 2016). Los valores de pH fueron seleccionados para favorecer la unión de calcio tanto a los grupos fosfatos como carboxilatos (Mekmene y Gaucheron, 2011). El electrodo de ion selectivo determina la actividad de calcio libre y no su concentración. La siguiente ecuación relaciona actividad con concentración:

$$c_i = \frac{a_i}{\gamma_i} \quad \text{Ecuación 14}$$

donde, c_i es la concentración de calcio libre (Ca_L); a_i es la actividad de calcio y γ_i es el coeficiente de actividad del calcio. El calcio unido (Ca_U) se obtuvo por diferencia entre el calcio total (Ca_T) determinado por espectroscopía de absorción atómica y el calcio libre (Ca_L) determinado con el electrodo de calcio:

$$\text{Ca}_U = \text{Ca}_T - \text{Ca}_L \quad \text{Ecuación 15}$$

donde, Ca_L es el calcio libre; Ca_U es el calcio unido al CMP y Ca_T es el calcio total.

El calcio unido se expresa por g de proteína para evitar inexactitudes con respecto al estado de agregación (o asociación) de las proteínas/péptidos (Lee y col., 1977).

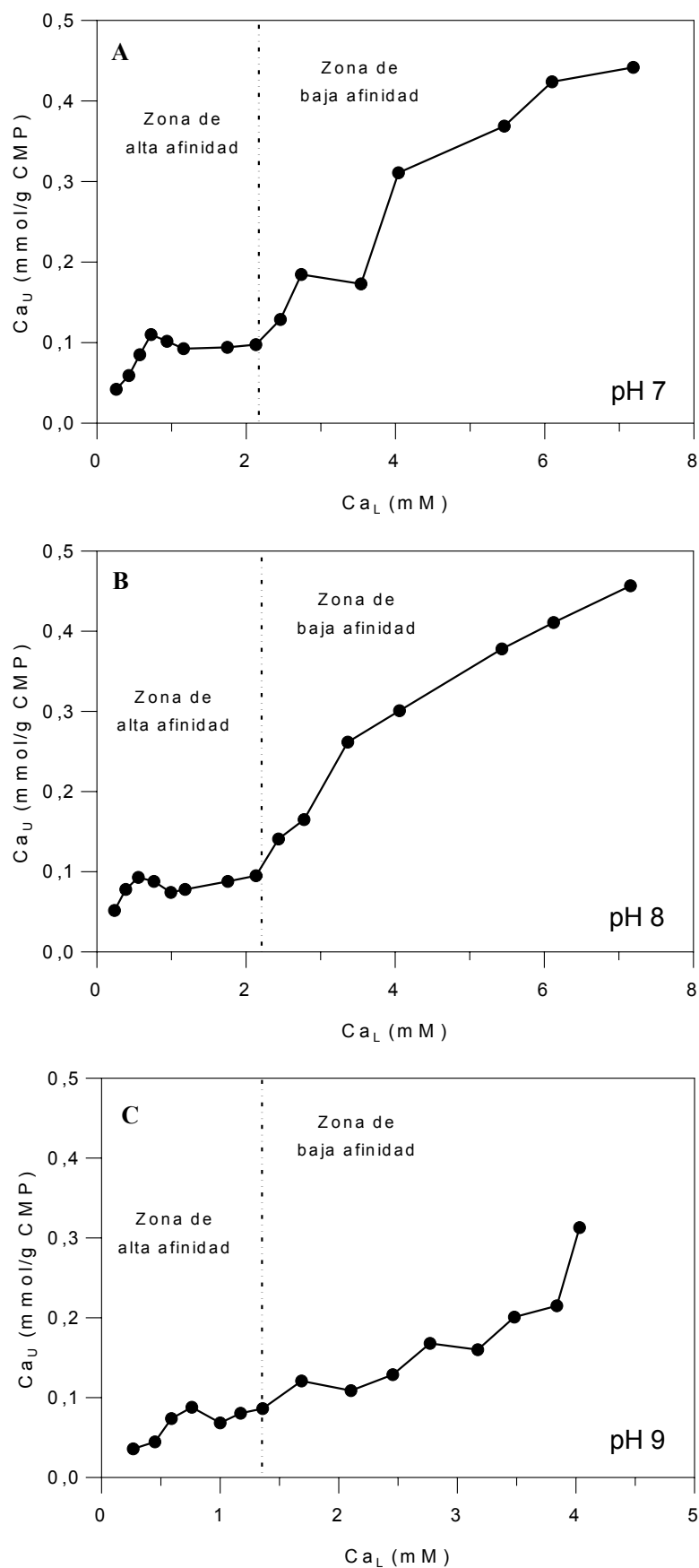


Figura 3.6. Isothermas de unión de Ca^{2+} para el CMP a: **A)** pH 7; **B)** pH 8 y **C)** pH 9 y una fuerza iónica de 0,05 M de KCl, asumiendo un peso molecular de 7500 Da para el CMP.

Si se grafica el C_{au} (mmoles de Calcio unido/g de CMP) en función del C_{al} se obtienen las isotermas de unión de calcio en las cuales se pueden reconocer los sitios de alta y baja afinidad. Los sitios de alta afinidad son saturables mientras que los de baja afinidad permanecen no saturables aún a concentraciones altas de C_{al} (Kilhoffer y col., 1988). Es decir que, para los sitios de baja afinidad, el C_{au} sería directamente proporcional a la concentración del C_{al} .

Las isotermas de unión de Ca^{2+} para el CMP a diferentes condiciones de pH (7, 8 y 9) se muestran en la **Figura 3.6**. A todos los pH estudiados, las isotermas mostraron una “zona de alta afinidad” en la cual el C_{au} se mantuvo constante aun aumentando la concentración de C_{al} . El valor de saturación encontrado para los tres valores de pH fue 0,1 mmoles de Ca/g de CMP. Sin embargo, la concentración de C_{al} disminuyó ligeramente con el aumento del pH: 2,1; 2,1 y 1,4 mM para pH 7, 8 y 9, respectivamente. La “zona de alta afinidad” se encuentra señalada en cada curva de la **Figura 3.6**. Hou y col. (2018) realizaron un experimento similar para péptidos obtenidos de hidrolizados de krill antártico y encontraron una curva que se saturó para una relación de 0,04 mmol/g para una concentración de C_{al} de 0,3 mM a pH 7,0.

Una vez alcanzado el C_{au} de saturación (0,1 mmoles de Ca/g de CMP), el C_{au} fue proporcional a la concentración de C_{al} , sin alcanzar un valor máximo o “plateau” como se observa para las tres isotermas de la **Figura 3.6**. Esa región se denominó “Zona de baja afinidad”.

A partir de los datos logrados también pueden construirse las gráficas de Klotz, que se obtienen graficando la inversa del C_{au} vs la inversa del C_{al} ($1/C_{au}$ vs $1/C_{al}$). En una situación ideal se consigue una recta a partir de la cual se puede calcular la constante de asociación aparente y la cantidad máxima de moles de calcio unidos. Este es el modelo más comúnmente usado en la bibliografía para el cálculo de la constante de asociación de un péptido (Berrocal y col., 1989; Jung y col., 2006; Zong y col., 2012).

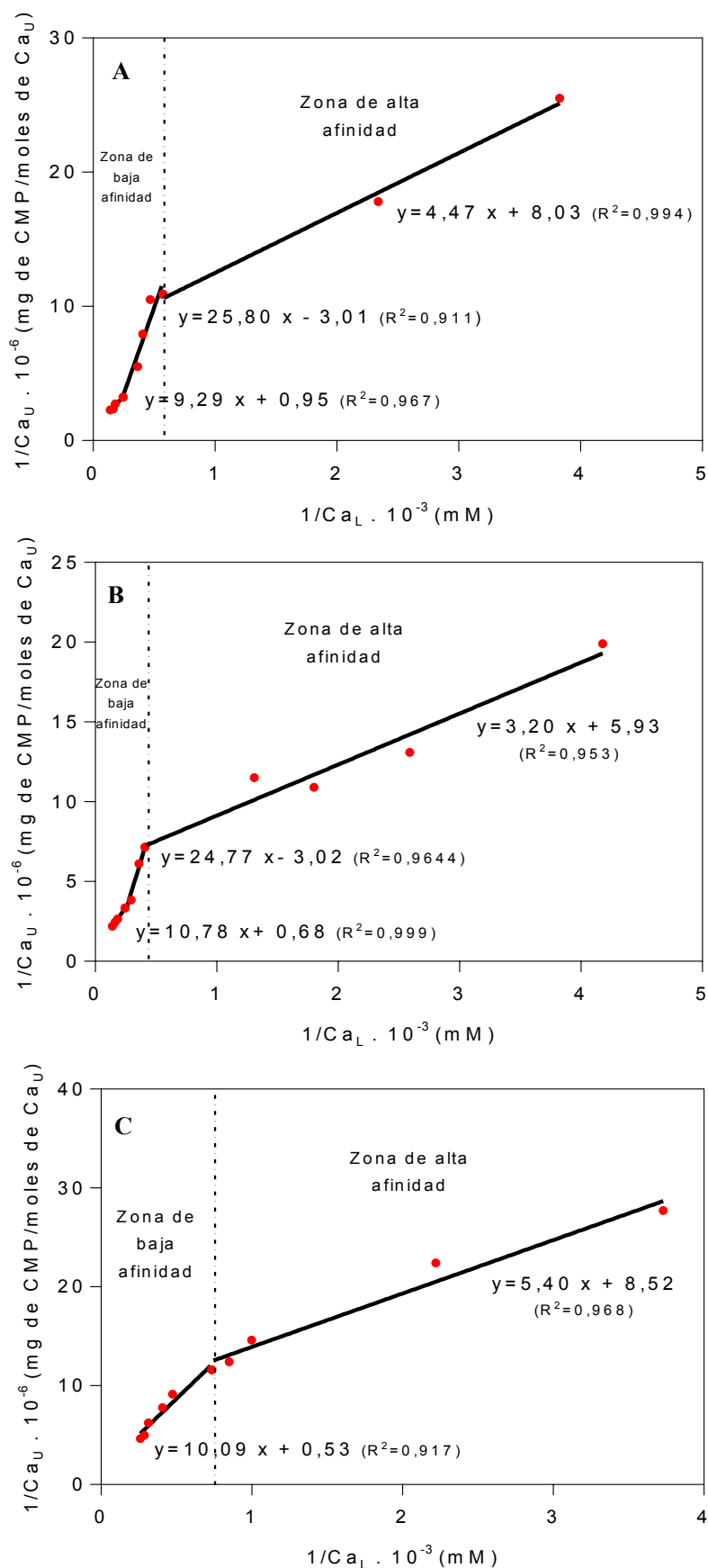


Figura 3.7. Gráficos de Klotz del sistema Ca/CMP a **A)** pH 7, **B)** pH 8 y **C)** pH 9 con una fuerza iónica de 0,05 M (KCl) y 25°C, asumiendo una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

De las curvas se obtuvieron la constante de asociación aparente (K_{ap}) y la cantidad máxima de moles de calcio unido por mg de CMP (n_i).

$$\frac{1}{Ca_U} = \frac{1}{n_i K_{ap} Ca_L} + \frac{1}{n_i} \quad \text{Ecuación 16}$$

La K_{ap} se definió según Vavrusova y Skibsted (2014) como:

$$K_{ap} = \frac{[CaL^+]}{[Ca^{2+}][L^-]} \quad \text{Ecuación 37}$$

Siendo L el ligando, que en este caso es el CMP.

Los gráficos de Klotz para el CMP se presentan en la **Figura 3.7** para las tres condiciones de pH evaluadas (7, 8 y 9). Cada diagrama muestra dos o tres rectas, todas de buen ajuste ($R^2 > 0,917$). Este comportamiento claramente demuestra que son varios los sitios de unión con Ca^{2+} en el CMP. Zhang y col. (2016) reconocieron dos rectas en los diagramas de Klotz y las adjudicaron a dos comportamientos diferentes en la unión del Calcio con la fosfovítina, un comportamiento para los sitios de alta afinidad y el otro para los de baja afinidad. También Lee y col. (1977) reconocieron dos rectas para una fosfoproteína de la dentina.

Tabla 3.1. K_{ap} y n_i en condiciones de bajo calcio libre (sitio de alta afinidad) obtenidos del gráfico de Klotz. Se asumió una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
K_{ap} (L mol ⁻¹)	1700 ± 300 ^a	2200 ± 300 ^a	1600 ± 50 ^a
n_i (moles de Ca ²⁺ /mol de CMP)	0,93 ± 0,04 ^a	1,26 ± 0,21 ^a	0,87 ± 0,12 ^a

Letras diferentes representan diferencias significativas a $p > 0,05$.

Los moles de máximo Ca^{2+} unido expresados por mol de CMP (n_i) y los valores de K_{ap} obtenidos del ajuste matemático de los datos en la condición de bajo calcio libre (valores altos de $1/\text{Ca}_L$) se muestran en la **Tabla 3.1**. Para los cálculos se consideró una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da (Mollé y Léonil, 2005). Se puede observar en dicha tabla que la cantidad máxima de Ca_U fue independiente del pH, siendo este valor cercano a 1 mol de Ca^{2+} por mol de CMP, y correspondería a un sitio de alta afinidad posiblemente relacionado con su grado de fosforilación. Según Mercier y Vilotte (1993), el residuo de Ser en posición 44 se encuentra siempre fosforilado. Mekmene y col. (2011) analizaron la K_{ap} y el número de sitios de unión con el Ca^{2+} del caseinato de potasio. Estos autores sugirieron que los sitios de unión aniónicos tienen la misma afinidad que los grupos fosfato a pH 6,8. Un análisis similar fue realizado por Berrocal y col. (1989) para caseinofosfopéptidos, concluyendo que la cantidad de calcio unido a los péptidos está relacionado directamente a su contenido de fósforo.

Los valores de K_{ap} fueron aproximadamente $2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ y no dependieron del pH (**Tabla 3.1**), reforzando la hipótesis de que el sitio de alta afinidad está fuertemente ionizado en los tres pH estudiados. Zhang y col. (2016) determinaron una K_{ap} para el sitio de alta afinidad de la fosfovitina de aprox. 10^4 L mol^{-1} independiente del pH entre 7 y 8 usando la misma técnica. Lee y col. (1977) también encontraron una K_{ap} más alta ($3,6 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) para el sitio de alta afinidad de una fosfoproteína obtenida de la dentina bovina.

Tabla 3.2. K_{ap} y n_i en condiciones de alto calcio libre (sitio de baja afinidad) obtenidos del gráfico de Klotz. Se asumió una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
$K_{ap} (\text{L mol}^{-1})$	132 ± 30^a	$63 \pm 1^{a, b}$	33 ± 1^b
n_i (moles de Ca^{2+} /mol de CMP)	$7,9 \pm 1,8^a$	$11,0 \pm 0,48^a$	$14,0 \pm 0,6^a$

Letras diferentes representan diferencias significativas a $p > 0,05$.

En condiciones de alto calcio libre (sitios de baja afinidad), se encontró que la cantidad máxima de calcio unido aumentó con el crecimiento del pH desde 7 a 9 (**Tabla 3.2**). En este caso, un mol de CMP unió entre 8 y 14 moles de calcio. Esto sugiere que son otros los grupos que pueden ligar calcio más allá del residuo de Ser fosforilada. Entre los aminoácidos, el aspártico y el glutámico son fuertes ligantes de calcio, aunque débiles en comparación a otros aniones.

Sin embargo, el efecto sinérgico es evidente tal como describieron Vavrusova y col. (2014) para otros polipéptidos. Por otro lado, si bien el número de moles de Ca^{2+} que incorporó el CMP aumentó con el pH, la K_{ap} tuvo el efecto opuesto al esperado. Los valores de K_{ap} en condiciones de alto calcio libre dependieron del pH: disminuyeron desde 132 L mol^{-1} (pH 7) a 33 L mol^{-1} (pH 9). También Lee y col. (1977) hallaron una K_{ap} para los sitios de baja afinidad que fue dos órdenes de magnitud más baja para los sitios de alta afinidad de una fosfoproteína de la dentina bovina. Mekmene y col. (2011) encontraron una K_{ap} de 191 L mol^{-1} para caseinofosfopéptidos a pH 6,5 y 154 L mol^{-1} para caseinato de potasio a pH 6,8. Además, el CMP tiene ocho residuos de Glu correspondientes a las posiciones 13, 24, 32, 35, 42, 46, 49 y 53 y dos residuos de Asp en las posiciones 10 y 43 (Brody, 2000). Esto sugiere que los grupos carboxilatos (residuos de glutamato y aspártico) estarían también involucrados en la unión con el calcio del CMP.

No solamente la Ser fosforilada podría ser la responsable del sitio de alta afinidad del CMP por el calcio. Aproximadamente un 50% del CMP está glicosilado (Thomä-Worringer y col., 2006), y el ácido siálico se encuentra entre un 5 y 11% en peso del total de CMP, dependiendo de su origen y modo de obtención (Fernando y Woonton, 2010). Considerando una masa molecular de ácido siálico de 309 g/mol , se puede estimar que un mol de CMP contiene entre 1,2 y 2,7 moles de ácido siálico. Como el complejo formado por la unión entre el siálico y calcio es 1:1 (Jaques y col., 1977), cada mol de CMP puede unir entre 1 y 3 moles de calcio por la presencia de siálico. Por ello, el grado de glicosilación del CMP no es un dato menor si se desea analizar su capacidad ligante de calcio.

En resumen, considerando todos los posibles sitios de interacción (de alta y baja afinidad) el CMP puede llegar a unir hipotéticamente entre 11 y 14 moles de calcio por mol, un dato similar al obtenido en este ensayo.

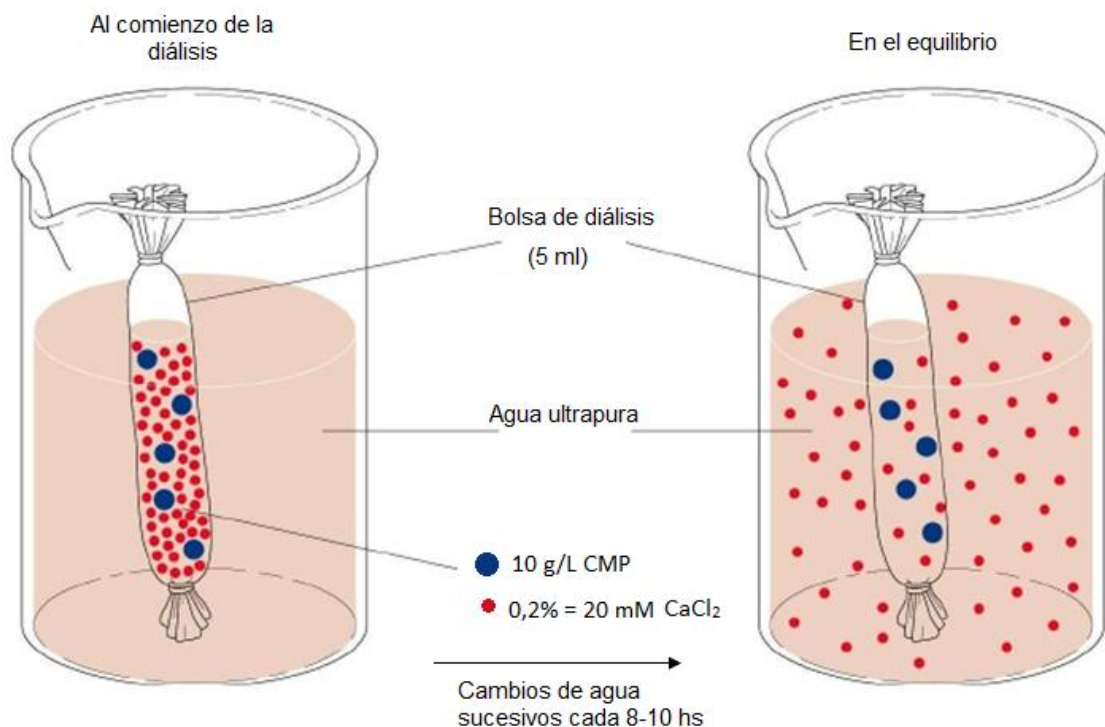
Conclusiones generales del Capítulo 3

Fue posible la evaluación de la capacidad ligante de calcio del CMP a través de diversas técnicas: DLS, diálisis, conductimetría, solubilidad de CaCl_2 en etanol, construcción de isothermas de unión de Ca^{2+} . Los resultados obtenidos en cada técnica fueron similares y lograron corroborar que la capacidad máxima de unión de calcio del CMP fue aproximadamente de 1,2 mmoles Ca^{2+} /g de CMP que equivale a 9 mol Ca^{2+} /mol de CMP a pH 7.

Dentro de las técnicas evaluadas, la construcción de isothermas de unión permitió interpretar mejor el mecanismo de interacción del CMP con el calcio y obtener una constante de asociación aparente. Se puede concluir, en primer lugar, que un mol de CMP une una cantidad equivalente de iones calcio, es decir una relación 1:1 con una K_{ap} de $2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. Posiblemente, este sitio de alta afinidad esté relacionado con la fosforilación del CMP. A concentraciones más altas de calcio en solución, cada mol de CMP liga más debilmente entre 8 y 10 moles de calcio a pH 7 en sitios de baja afinidad con una K_{ap} de 130 L mol^{-1} y fue dependiente del pH.

En segundo lugar, la electronegatividad de las moléculas puede explicar la formación de estructuras asociadas por pares de moléculas de CMP (dímeros, tetrámeros, hexámeros) en presencia de CaCl_2 . Una molécula de calcio se une a una molécula de CMP en un sitio de alta afinidad. La neutralización de esa fuerte carga negativa (del sitio de alta afinidad) permite la interacción entre dos moléculas de CMP a través de los pocos aminoácidos hidrofóbicos cercanos al residuo N-terminal formando dímeros. Al incorporarse más calcio a la solución de CMP, los grupos negativos (fosfatos, carboxilatos y glicósidos) de las moléculas vecinas reemplazan a los contraiones Cl^- o OH^- y se asocian en forma de tetrámeros. Con mayor cantidad de calcio presente, los tetrámeros se unen a los dímeros que se encuentran en abundancia. Una vez alcanzada la equivalencia electrostática (determinada por la conductimetría) en aproximadamente 1,2 mmoles/g de CMP, el CMP se asocia a hexámero.

ANEXO I: Cálculos de la determinación de la fracción no dializable de calcio



Datos:

- Volumen de la bolsa diálisis= 5 ml
- Contenido inicial de calcio del CMP = 6,82 mg Ca^{2+} /g CMP
- Concentración de CMP dentro de la bolsa de diálisis= 10 g/L
- Concentración de CaCl_2 dentro de la bolsa de diálisis= 20 mM
- Peso Molecular CaCl_2 = 111 g/mol
- Peso Molecular Ca^{2+} = 40 g/mol
- El Calcio fuera de la bolsa de diálisis fue determinado por espectroscopía de absorción atómica (EAA)
- Se realizó un Blanco conteniendo sólo CMP 10 g/L.

Concentración de calcio determinado fuera de la bolsa de diálisis por EAA (Calcio que atravesó la membrana) (mg/L)			
	Blanco	Dializado A	Dializado B (duplicado)
Muestra	1,529	2,785	2,835
Duplicado	1,193	2,782	2,777
Promedio	1,361	2,7835	2,806

$$\begin{array}{ccccc} \text{CALCIO TOTAL} & & \text{CALCIO} & & \text{CALCIO} \\ \text{dentro de la bolsa de} & \text{=} & \text{Aportado por el} & \text{+} & \text{Aportado por el} \\ \text{diálisis} & & \text{CaCl}_2 & & \text{CMP} \end{array}$$

$$\text{Calcio aportado por el CaCl}_2 = \frac{0,2 \text{ g}}{100 \text{ ml}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{111 \text{ g}} \cdot 5 \text{ ml} \cdot \frac{1000 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} = 9 \cdot 10^{-2} \text{ mmol Ca}^{2+}$$

$$\text{Calcio aportado por el CMP} = \frac{10 \text{ g}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{682 \text{ mg Ca}}{100 \text{ g}} \cdot 5 \text{ ml} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{1 \text{ mmol}}{40 \text{ mg}} = 8,5 \cdot 10^{-3} \text{ mmol Ca}^{2+}$$

$$\text{Calcio Total dentro de la bolsa} = 9 \cdot 10^{-2} + 8,5 \cdot 10^{-3} = 0,099 \text{ mmol Ca}^{2+}$$

Blanco:

$$\text{Calcio fuera de la bolsa de diálisis} = \frac{1,361 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{1 \text{ mmol}}{40 \text{ mg}} \cdot 958,47 \text{ ml} = 0,033 \text{ mmol Ca}^{2+}$$

$$\text{Masa de CMP dentro de la bolsa} = \frac{10 \text{ g}}{1 \text{ L}} \cdot 5 \text{ ml} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0,05 \text{ g}$$

Dializado A:

El calcio total determinado fuera de la bolsa de diálisis por EAA fue restado por el valor del calcio determinado en el blanco:

$$\text{Calcio total fuera de la bolsa de diálisis (EAA)} = \frac{2,7835 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{1 \text{ mmol}}{40 \text{ mg}} \cdot 991,47 \text{ ml} = 0,069 \text{ mmol Ca}^{2+}$$

$$\text{Calcio fuera de la bolsa de diálisis} = \text{Calcio total fuera de la bolsa de diálisis} - \text{Ca del blanco}$$

$$\text{Calcio fuera de la bolsa de diálisis} = 0,069 \text{ mmol} - 0,033 \text{ mmol} = 0,036 \text{ mmol Ca}^{2+}$$

$$\text{Calcio ligado} = \text{Calcio inicial total} - \text{Calcio fuera de la bolsa de diálisis}$$

$$\text{Calcio ligado} = 0,099 \text{ mmol} - 0,036 = 0,062 \text{ mmol Ca}^{2+}$$

$\text{Fracción no dializable de calcio (mmol Ca}^{2+} \text{ /g CMP)} = \frac{0,062 \text{ mmol}}{0,05 \text{ g}} = 1,24 \text{ mmol Ca}^{2+} \text{ /g CMP}$
--

Dializado B:

El calcio total determinado fuera de la bolsa de diálisis por EAA fue restado por el valor del calcio determinado en el blanco:

$$\text{Calcio fuera de la bolsa de diálisis} = 0,066 \text{ mmol} - 0,033 \text{ mmol} = 0,034 \text{ mmol Ca}^{2+}$$

$$\text{Calcio ligado} = \text{Calcio inicial total} - \text{Calcio fuera de la bolsa de diálisis}$$

$$\text{Calcio ligado} = 0,099 \text{ mmol} - 0,034 \text{ mmol} = 0,065 \text{ mmol Ca}^{2+}$$

$$\text{Fracción no dializable de calcio (mmol Ca}^{2+}\text{/g CMP)} = \frac{0,065 \text{ mmol}}{0,05 \text{ g}} = \mathbf{1,30 \text{ mmol Ca}^{2+}\text{/g CMP}}$$

	BLANCO	DIALIZADO A	DIALIZADO B		
Volumen de agua fuera de la bolsa	958,47 ml	991,47 ml	947,05 ml		
CALCIO TOTAL INICIAL = Aportado por el CaCl ₂ + el aportado por el CMP iniciales (mmol)	0,098615 mmol	0,098615 mmol	0,098615 mmol		
CALCIO FUERA TOTAL de la bolsa de diálisis (Determinado por EAA)	0,0326119 mmol	0,0689939 mmol	0,0664355 mmol		
CALCIO FUERA de la bolsa de diálisis	-	0,036382 mmol	0,0338236 mmol		
CALCIO LIGADO = CALCIO TOTAL INICIAL - CALCIO FUERA de la bolsa de diálisis	-	0,062233 mmol	0,0647914 mmol		
FRACCIÓN NO DIALIZABLE DE CALCIO (mmol Ca ²⁺ /g CMP)	-	1,24466 mmol Ca²⁺/g CMP	1,295828 mmol Ca²⁺/g CMP	1,27024588 mmol Ca²⁺/g CMP	0,03618069
FRACCIÓN NO DIALIZABLE DE CALCIO (mmol Ca ²⁺ /mol CMP) (masa estimada del CMP 7500 Da)	-	9,33496698 mol Ca²⁺/mol CMP	9,71872115 mol Ca²⁺/mol CMP	9,52684407 mol Ca²⁺/g CMP	0,27135518
				PROMEDIO	Desvío Estándar

Resultados: Fracción no dializable de calcio (Unido al CMP)

PROMEDIO	Desvío Estándar
1,3 mmol Ca²⁺/g CMP	0,1
9,5 mol Ca²⁺/mol CMP	0,3

Referencias

- Bao, Xiao Lan, Song Mei, Zhang Jing, Chen Yang y Guo Shun Tang. 2007. Calcium-binding ability of soy protein hydrolysates. *Chinese Chemical Letters*, 18(9), 1115-1118.
- Bennick, A. 1976. The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein A, common to human parotid and submandibular secretions. *Biochemical Journal*, 155(1), 163-169.
- Berrocal, Rafael, Chanton Serge, Juillerat Marcel A., Favillare Blaise, Scherz Jean-Claude y Jost Rolf. 1989. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *Journal of Dairy Research*, 56(3), 335-341.
- Brody, Ernest P. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84(Supplement S1), 39-46.
- Burns, P., Binetti A., Torti P., Kulozik U., Forzani L., Renzulli P. et al. 2015. Administration of caseinomacropeptide-enriched extract to mice enhances the calcium content of femur in a low-calcium diet. *International Dairy Journal*, 44(0), 15-20.
- Carnovale, Valérie, Britten Michel, Couillard Charles y Bazinet Laurent. 2015. Impact of calcium on the interactions between epigallocatechin-3-gallate and β -lactoglobulin. *Food Research International*, 77, 565-571.
- Damodaran, S., Parkin, K., y Fennema, O. 2018. *Fennema's food chemistry*. Boca Raton: CRC Press.
- Dybowska, Brygida E. 2011. Whey protein-stabilized emulsion properties in relation to thermal modification of the continuous phase. *Journal of Food Engineering*, 104(1), 81-88.
- Erabit, Nicolas, Flick Denis y Alvarez Graciela. 2013. Effect of calcium chloride and moderate shear on β -lactoglobulin aggregation in processing-like conditions. *Journal of Food Engineering*, 115(1), 63-72.
- Farías, M. E., Martínez M. J. y Pilosof A. M. R. 2010. Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79-88.
- Fernando, Susil Francis y Woonton Brad William. 2010. Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(4), 359-366.
- Haghtalab, Ali y Badizad Mohammad Hasan. 2016. Solubility of gypsum in aqueous NaCl + K₂SO₄ solution using calcium ion selective electrode-investigation of ionic interactions. *Fluid Phase Equilibria*, 409, 341-353.
- Hou, Hu, Wang Shikai, Zhu Xiao, Li Qiqi, Fan Yan, Cheng Dong et al. 2018. A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex. *Food Chemistry*, 243, 389-395.
- Jaques, Larry W., Brown Ellen B., Barrett Joy M., Brey Wallace S. y Weltner William. 1977. Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, N° 13, 4533-4538.
- Jung, Won-Kyo, Karawita Rohan, Heo Soo-Jin, Lee Bae-Jin, Kim Se-Kwon y Jeon You-Jin. 2006. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 41(9), 2097-2100.
- Kilhoffer, MC, Roberts Daniel M., Adibi Abiodun O., Wattersons D. Martin y Haiech Jacques. 1988. Investigation of the mechanism of calcium binding to calmodulin. Use of engineered proteins with internal tryptophan reporter groups and perturbation techniques to probe the mechanism of ligand-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 17023-17029.
- Korhonen, Hannu y Pihlanto Anne. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Lee, Sandra L., Veis Arthur y Glonek Thomas. 1977. Dentin phosphoprotein: an extracellular calcium-binding protein. *Biochemistry*, 16(13), 2971-2979.
- Lee, Yeon Sook, Noguchi T. y Naito H. 2007. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *British Journal of Nutrition*, 43(3), 457-467.

- Martinez, M. J., Farías M. E. y Pilosof A. M. R. 2011. Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 860-867.
- Mekmene, Omar y Gaucheron Frédéric. 2011. Determination of calcium-binding constants of caseins, phosphoserine, citrate and pyrophosphate: A modelling approach using free calcium measurement. *Food Chemistry*, 127(2), 676-682.
- Mercier, Jean-Claude y Vilotte Jean-Luc. 1993. Structure and Function of Milk Protein Genes. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3079-3098.
- Mollé, Daniel y Léonil Joëlle. 2005. Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). *International Dairy Journal*, 15(5), 419-428.
- Nakano, Takuo y Ozimek Lech. 1999. Determination of sialic acid by the thiobarbituric acid reaction in sweet whey and its fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2613-2616.
- Rodríguez Furlán, Laura T. y Campderrós Mercedes E. 2015. Effect of Mg^{2+} binding on transmission of bovine serum albumin (BSA) through ultrafiltration membranes. *Separation and Purification Technology*, 150, 1-12.
- Saito, Yuichi y Kimura Shuichi. 1998. Minimum effective dose of casein phosphopeptides (CPP) for enhancement of calcium absorption in growing rats. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 68(5), 335-340.
- Sato, Ryuichio, Noguchi Tadashi y Naito Hiroshi. 1986. Casein Phosphopeptide (CPP) Enhances Calcium Absorption from the Ligated Segment of Rat Small Intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 32(1), 67-76.
- Tang, Ning y Skibsted Leif H. 2016. Calcium Binding to Amino Acids and Small Glycine Peptides in Aqueous Solution: Toward Peptide Design for Better Calcium Bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(21), 4376-4389.
- Thomä-Worringer, C., Sørensen John y López-Fandiño Rosina. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16(11), 1324-1333.
- Thöma-Worringer, Corinna, Siegert Nadja y Kulozik U. 2007. Foaming properties of caseinomacropeptide -II. Impact of pH and ionic strength. 62(3), 253-255.
- Urbonaitė, V., de Jongh H. H. J., van der Linden E. y Pouvreau L. 2015. Water holding of soy protein gels is set by coarseness, modulated by calcium binding, rather than gel stiffness. *Food Hydrocolloids*, 46, 103-111.
- Valente, Artur J. M., Ribeiro Ana C. F., Rita Marigese B. B. J., Carvalho Rui A., Estes Miguel A. y Lobo Victor M. M. 2011. Transport properties of aqueous solutions of calcium lactate in the absence and presence of β -cyclodextrin. *Journal of Molecular Liquids*, 161(3), 125-131.
- Vavrusova, Martina y Skibsted Leif H. 2014. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1198-1204.
- Wang, Li, Ding Yuanyuan, Zhang Xinxia, Li Yongfu, Wang Ren, Luo Xiaohu et al. 2018. Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination. *Food Chemistry*, 239, 416-426.
- Zhang, Xiaowei, Geng Fang, Huang Xi y Ma Meihu. 2016. Calcium binding characteristics and structural changes of phosvitin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 159, 76-81.
- Zhao, Lina, Huang Shunli, Cai Xixi, Hong Jing y Wang Shaoyun. 2014. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 10, 46-53.
- Zong, Hong, Peng Lijuan, Zhang Saisai, Lin Ying y Feng Fengqin. 2012. Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides. *European Food Research and Technology*, 235(5), 811-816.

CAPITULO 4

INHIBICIÓN DE LA PRECIPITACIÓN DE SALES DE CALCIO POR EL CMP

CAPITULO 4

Durante la digestión de los alimentos, al ingerir una sal de calcio, debido a la acidez que prevalece en el estómago se forma calcio iónico que puede precipitar como fosfatos y carboxilatos cuando el quimo (alimentos parcialmente digeridos) se transfiere a las condiciones cada vez más alcalinas que prevalecen en el intestino, a menos que una unión compleja competitiva impida la precipitación. El proceso de precipitación resultante del aumento del pH puede inhibirse cinéticamente y, en efecto, aumentar la bioaccesibilidad. La bioaccesibilidad se define como la fracción soluble de un compuesto que se libera del quimo en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, está disponible para su absorción intestinal (generalmente basada en procedimientos *in vitro*) (Burgos y col., 2018). Está bien establecido que, aunque la cantidad total de un nutriente es potencialmente bioaccesible, muy pocos se convierten completamente en su forma soluble para su absorción durante la digestión. La bioaccesibilidad es el primer paso para que un nutriente esté disponible, o sea que pueda ser liberado de la matriz alimenticia para introducirse en las células del intestino.

La absorción del calcio tiene lugar en el intestino en un transporte transcelular regulado por la Vitamina D principalmente en el duodeno, o por un proceso paracelular no saturable a través del intestino, donde el pH es ligeramente alcalino y la reprecipitación suele disminuir su bioaccesibilidad (Vavrusova y col., 2014a). El transporte de calcio transcelular involucra tres pasos principales: 1) la entrada a través de la membrana del borde en cepillo del enterocito, 2) el movimiento intracelular y 3) la secreción a través de la membrana basolateral hacia el líquido extracelular. El transporte paracelular no depende de la vitamina D, sino de la solubilidad del calcio, del tiempo en que el quimo pasa a un segmento intestinal particular, y de la permeabilidad de la mucosa al calcio. El transporte paracelular representa la mayor parte de la absorción de calcio cuando la ingesta es adecuada y especialmente cuando es alta (Bronner y Pansu, 1999).

La reducción de la bioaccesibilidad de calcio con sus consecuencias para la salud parece estar relacionada con la precipitación de calcio en esta etapa de la digestión y la ausencia de ligandos o inhibidores para la precipitación.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la inhibición de la precipitación de sales de calcio por el CMP. En primer lugar, se estudió con CaCl_2 y CaCO_3 en un medio

alcalino simulando el pH y la fuerza iónica del intestino (buffer fosfato pH 8). También se analizó si dicha inhibición se vio afectada por un tratamiento previo de cambio de pH del CMP (pasar de pH 7 a 3,5 y luego volver a 7). En segundo lugar, se analizó el efecto del CMP en la solubilidad acuosa del citrato de calcio (Cit_2Ca_3) y el lactato de calcio (Lac_2Ca), que son sales de uso terapéutico.

1. Inhibición de la precipitación de sales de calcio por el CMP en buffer fosfato

Uno de los ensayos clásicos que se utilizan para determinar la capacidad ligante de calcio de los péptidos y proteínas es la solubilidad de sales de calcio (CaCl_2 o CaCO_3) en buffer fosfato a pH 8. Dicho ensayo simula la precipitación de fosfato de calcio que se lleva a cabo en el medio intestinal (rico en fosfatos y pH alcalino) y que afecta la bioaccesibilidad del calcio. Se considera que la inhibición de la precipitación está relacionada directamente a la capacidad ligante de calcio de los péptidos y proteínas, los cuales permanecen solubles en el buffer fosfato. De nuestro conocimiento, este ensayo fue reportado por primera vez por Sato y col. (1991) para caseinofosfopéptidos. Se ha utilizado para determinar la capacidad ligante de calcio de un péptido de soja (Bao y col., 2008), de hidrolizados de proteínas de *Auxis thazard* una especie de atún (Chen y col., 2019), de hidrolizados de frijoles (Budseekoad y col., 2018), de péptidos de hidrolizados de proteínas del suero de queso (Zhao y col., 2014) y, recientemente, Zhang y col. (2019) determinaron la capacidad ligante de calcio un decapeptido proveniente de los huesos de un pez (*Gadus Macrocephalus*) con esta técnica.

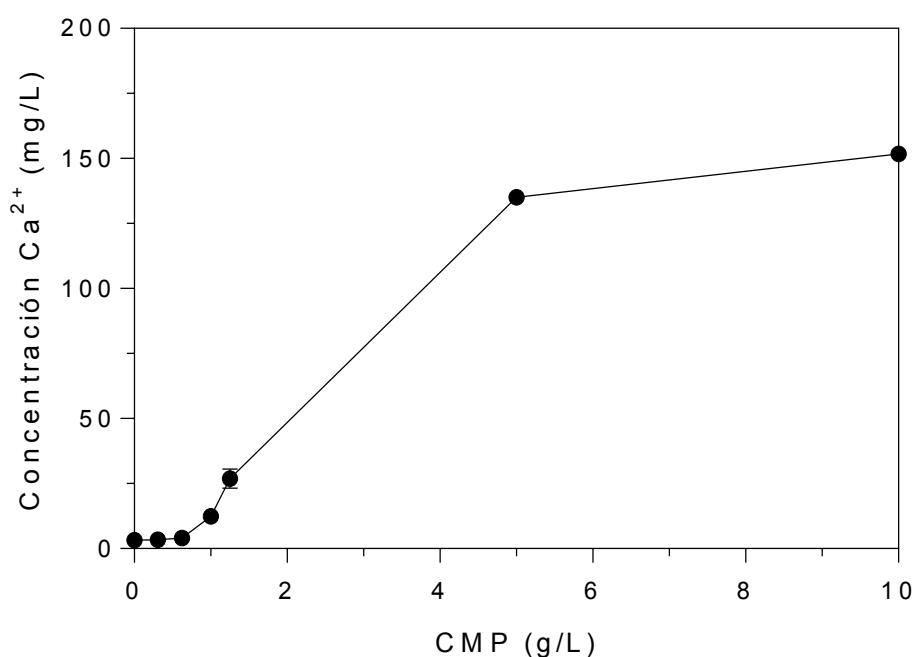


Figura 4.1. Concentración de calcio iónico en solución buffer fosfato en función de la concentración de CMP. Sal: CaCl_2 . Las barras representan el desvío estándar (n= 3).

Por lo antes dicho, se realizó un ensayo exploratorio para determinar la concentración óptima de CMP que permita analizar su efecto en la inhibición de la precipitación del fosfato de calcio. Para ello, se prepararon muestras con concentraciones variables de CMP entre 0 y 10 g/L y concentraciones fijas de buffer fosfato (20 mM) y CaCl_2 (5 mM) según la técnica descrita en la **Sección 2.13, Materiales y Métodos**. La determinación de calcio en el sobrenadante (calcio soluble) se realizó por espectroscopía de absorción atómica. Los resultados se pueden observar en la **Figura 4.1**. La solubilidad del Ca^{2+} en buffer fosfato (pH 8) en ausencia de CMP fue muy baja ($3,2 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$) debido a la precipitación de fosfato de calcio insoluble. La presencia de CMP en concentraciones superiores a 0,5 g/L, inhibió la formación de fosfato de calcio de forma significativa. Por ejemplo, la solubilidad del calcio aumentó un 390% ($12,4 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$) en presencia de 1 g/L de CMP. Notablemente, con más de 5 g/L de CMP se alcanzó la máxima solubilidad (aprox. 150 mg L^{-1}). Jung y col. (2006) reportaron una capacidad ligante de calcio de 32 mg L^{-1} para 0,25 g/L de un péptido de 1442 Da purificado a partir de proteínas de espinas del pez *Theragra chalcogramma*. En el mencionado trabajo, el calcio soluble fue determinado a través de un electrodo selectivo, que posee bajo nivel de confiabilidad debido a la interferencia en la medición de los aniones fosfatos. La mejor forma de cuantificar el calcio en esta técnica es la absorción atómica, donde previamente se precipitan los fosfatos con lantano para evitar interferencias. Por ello, los resultados se expresan en mg de calcio iónico por unidad de volumen.

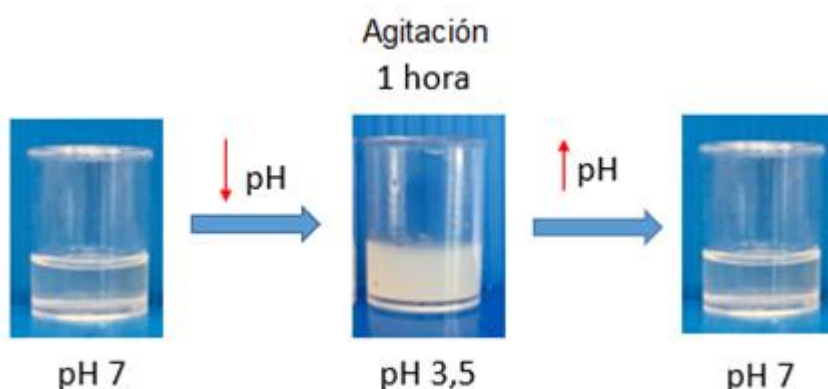


Figura 4.2. Esquema del procedimiento de reversión del pH de las soluciones de CMP.

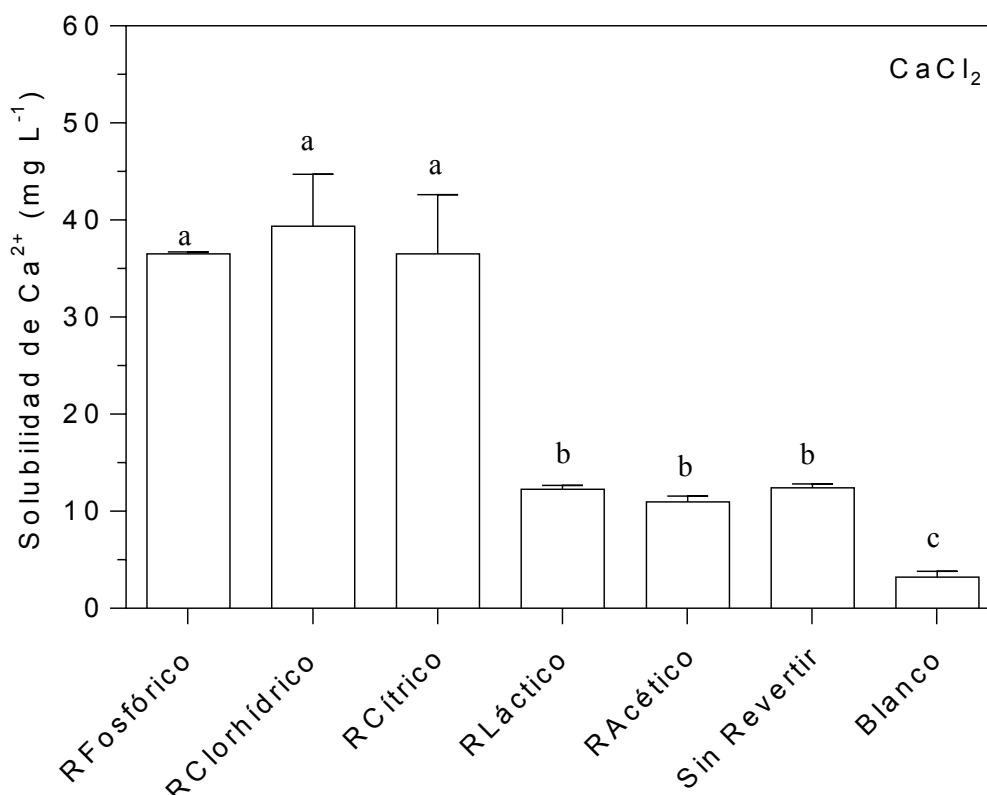


Figura 4.3. Solubilidad de calcio iónico en buffer fosfato con 1 g/L de CMP. Sal: CaCl_2 . El CMP recibió un tratamiento de reversión del pH con diferentes ácidos: ácido fosfórico (RFosfórico); clorhídrico (RClorhídrico); cítrico (RCítrico); láctico (RLáctico) y acético (RAcético). La muestra “Sin Revertir” correspondió al CMP que no sufrió reversión de pH. “Blanco”: ausencia de CMP. Las barras representan el desvío estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

La segunda parte del ensayo consistió en cuantificar la inhibición de la precipitación del fosfato de calcio por el CMP que recibió un tratamiento previo de reversión de pH, es decir, partiendo del pH neutro, se disminuyó a 3,5 bajo agitación durante 1 h y luego, se llevó finalmente a neutro. La **Figura 4.2** muestra el procedimiento de reversión del pH de las soluciones. El cambio de pH se realizó con ácido de alta normalidad para evitar la dilución del CMP como en Farías y Pilosof (2016). Se utilizaron diferentes ácidos (clorhídrico, cítrico, acético, fosfórico y láctico), con el objeto de interpretar el efecto del anión en la inhibición de la precipitación de calcio. Cada uno de los ácidos tiene diferentes constantes de disociación. El HCl es un ácido fuerte y se ioniza completamente en solución. Las constantes de disociación para los ácidos láctico y acético son 3,86 y 4,8, respectivamente. Los restantes ácidos tienen tres constantes de disociación (pK_a): 3,1; 4,6 y 6,4 para el ácido cítrico y 2,1; 7,2 y 12,7 para el ácido fosfórico. A pH 3,5, el CMP tiende a autoensamblarse a través de interacciones electrostáticas (Farías y col., 2010) y su velocidad de

autoensamblado es dependiente del pH, la temperatura y el tipo de ácido utilizado (Farías y col., 2016). Visualmente, el autoensamblaje se observa como un enturbiamiento progresivo en las soluciones.

La **Figura 4.3** muestra el efecto en la inhibición de la precipitación de fosfato de calcio en presencia de CMP con tratamiento previo de reversión de pH cuando se usa CaCl_2 . Las muestras de CMP cuyo pH fue revertido con ácido láctico (RLáctico) y acético (RAcético) no mostraron diferencias en la solubilidad presentada con respecto al CMP sin reversión de pH (Sin Revertir) ($p > 0,05$). Sin embargo, la presencia de CMP para estos casos representó un incremento del 380% en la solubilidad de la muestra “Blanco” (ausencia de CMP), confirmando que el CMP inhibe la precipitación del fosfato de calcio, interactuando con el calcio iónico. Por otro lado, la solubilidad del calcio iónico superó el 1100% en presencia de CMP cuyo pH fue revertido previamente usando los ácidos fosfórico, clorhídrico y cítrico (RFosfórico, RClorhídrico y RCítrico) con respecto a los ensayos “Blanco” y un 290% con respecto al ensayo de CMP “Sin Revertir”.

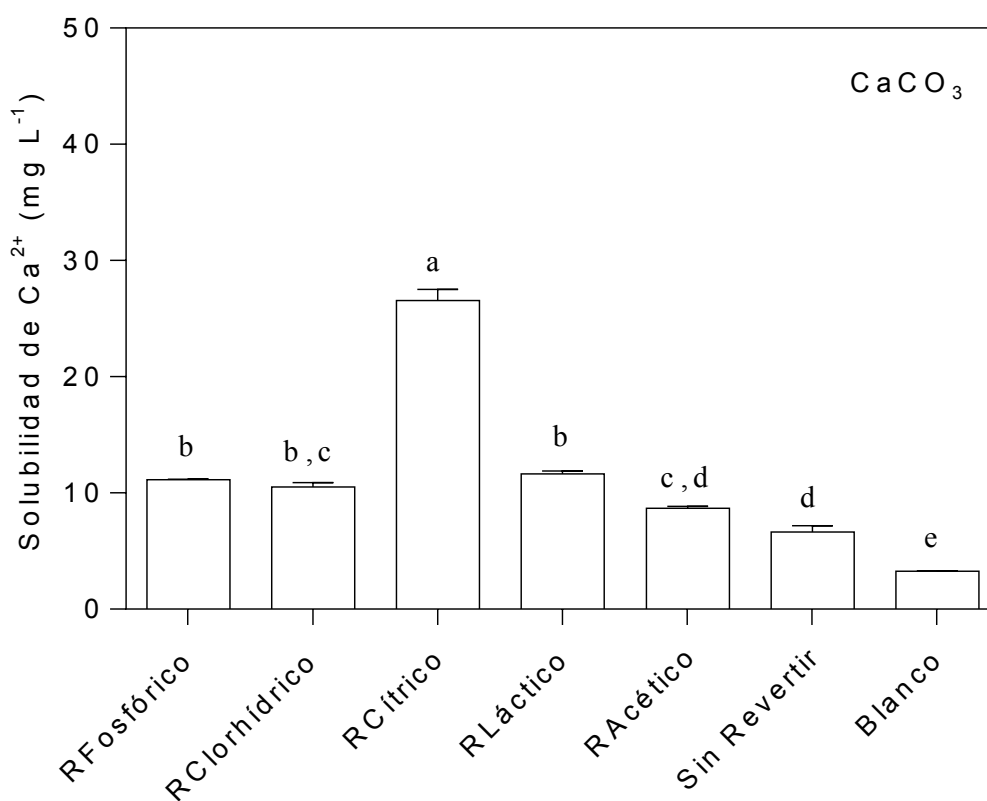


Figura 4.4. Solubilidad de calcio iónico en medio buffer fosfato con 0,5 g/L de CMP. Sal: CaCO_3 . El CMP recibió un tratamiento de reversión del pH con diferentes ácidos: ácido fosfórico (RFosfórico); clorhídrico (RClorhídrico); cítrico (RCítrico); láctico (RLáctico) y acético (RAcético). La muestra “Sin Revertir” correspondió al CMP que no sufrió reversión de pH. “Blanco”: solubilidad de calcio en ausencia de CMP. Las barras representan el desvío estándar ($n= 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Con fines de comparación, se realizó un ensayo similar usando CaCO_3 (**Figura 4.4**). El CaCO_3 es muy utilizado en la industria farmacéutica como agente precipitante de fosfatos en pacientes con hiperfosfatemia (D'Haese y col., 2003; Koiwa y col., 2018), y, algunos autores prefieren su utilización para este ensayo (Chen y col., 2014). Las concentraciones finales de las mezclas fueron 20 mM de buffer fosfato de sodio, 6 mM de CaCO_3 y 0,5 g/L de CMP. Los resultados mostraron que la solubilidad del calcio iónico en presencia de CMP revertido con ácido cítrico fue muy superior ($26,4 \pm 1,6 \text{ mg L}^{-1}$) a los otros experimentos. Por otro lado, el CMP previamente revertido con los ácidos fosfórico, clorhídrico y láctico aumentaron la solubilidad 150% con respecto al CMP sin tratamiento previo. No hubo diferencias significativas en la solubilidad del calcio iónico en aquellas muestras de CMP revertido previamente con ácido acético y sin revertir ($p > 0,05$). Los resultados confirmaron que el tratamiento previo de cambio de pH del CMP con los ácidos cítrico, fosfórico, clorhídrico y láctico inhibió la precipitación de fosfato de calcio en mayor medida que usando el CMP sin revertir.

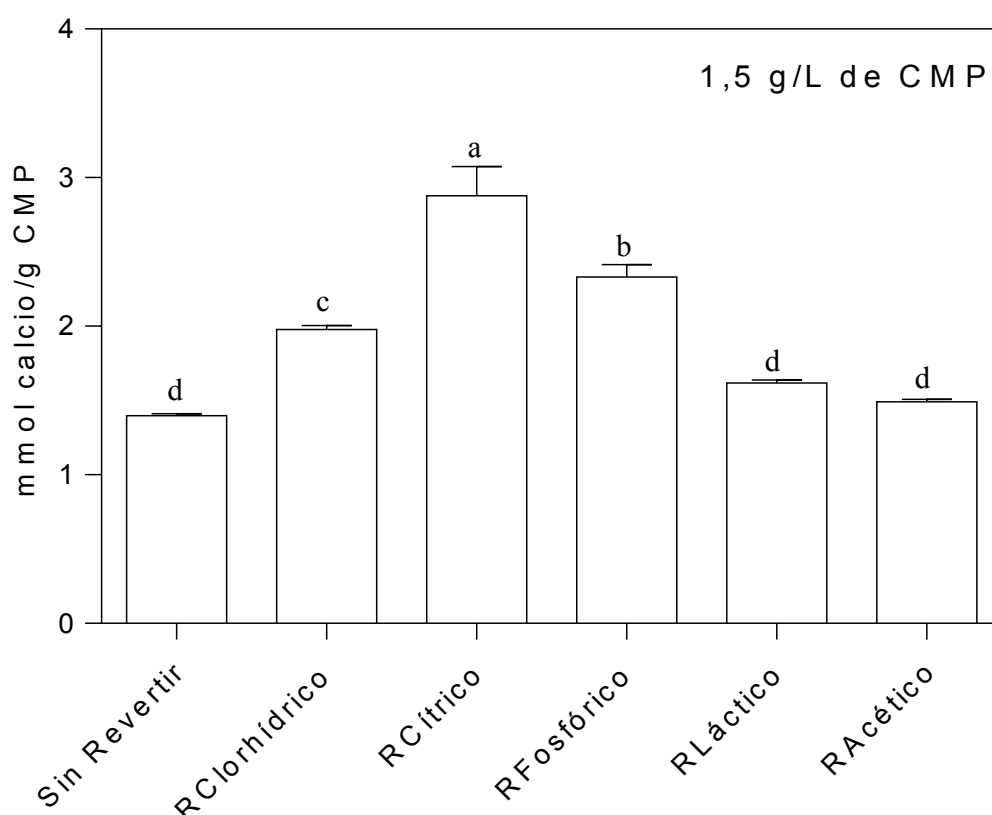


Figura 4.5. Capacidad ligante de calcio del CMP (Sin Revertir) y con tratamiento previo de reversión de pH con diferentes ácidos: clorhídrico (RClorhídrico), cítrico (RCítrico), fosfórico (RFosfórico), láctico (RLáctico), acético (RAcético) a pH 7. Las barras representan el desvío estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el **Capítulo 3** se mostró que la técnica de determinación de la solubilidad de CaCl_2 en etanol en presencia de CMP es una técnica sencilla y rápida para evaluar la capacidad ligante de calcio del CMP. El CMP, que no es soluble en etanol, precipita junto al calcio ligado. El calcio remanente, que permanece en solución, se titula con EDTA. La **Figura 4.5** muestra los resultados obtenidos por esta metodología para soluciones de CMP con un tratamiento previo de reversión de pH con diferentes ácidos. No hubo diferencias significativas para el CMP sin tratamiento (Sin Revertir) y aquél que fue revertido con ácido láctico y acético (1,4 - 1,6 mmol de calcio por g de CMP). Por otro lado, el CMP previamente revertido con los ácidos fosfórico, cítrico o clorhídrico puede ligar entre 2 y 3 mmoles de calcio por g de CMP, evidenciando la importancia de los aniones en la capacidad ligante de calcio del CMP.

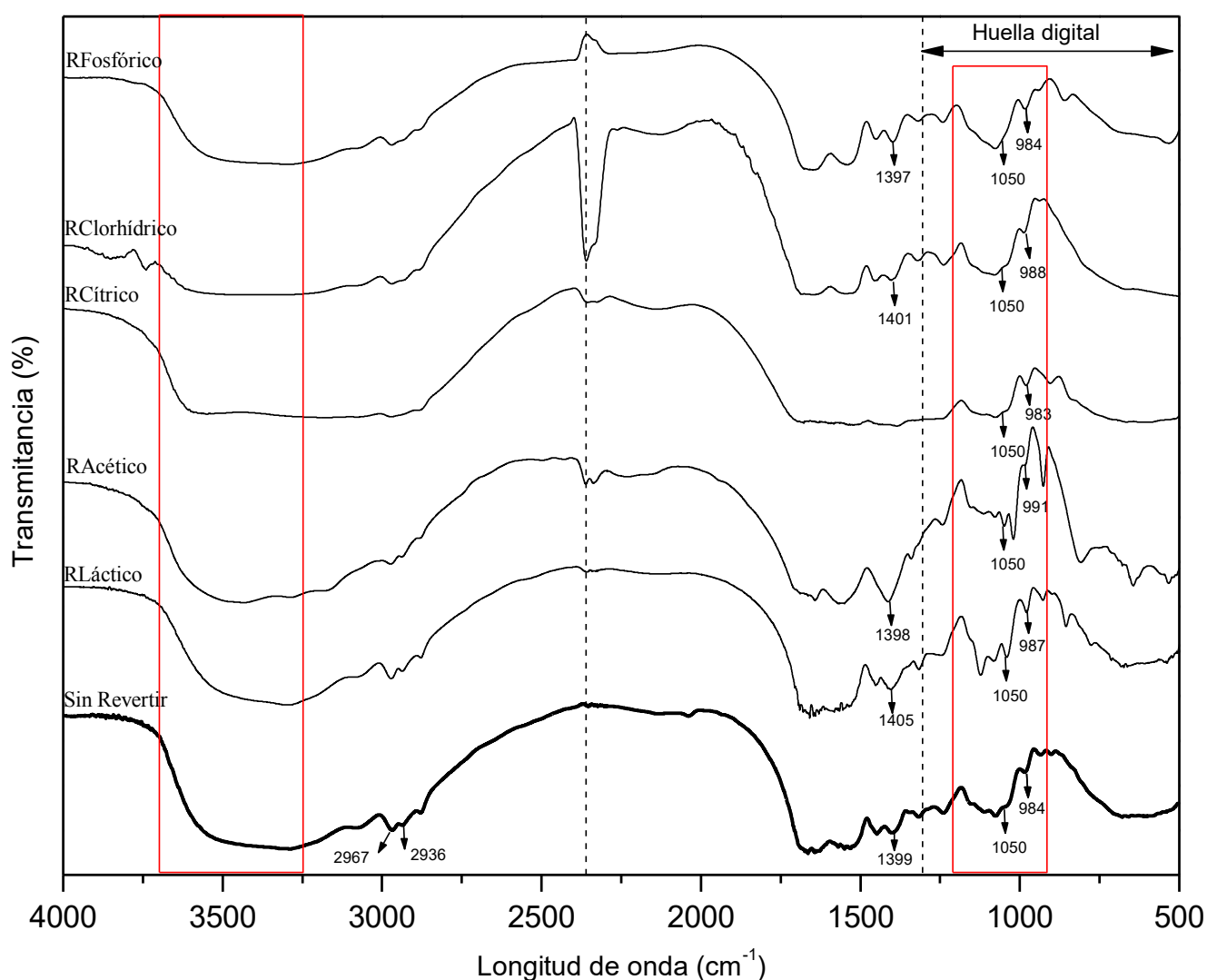


Figura 4.6. Espectros FTIR del CMP (Sin Revertir) y con un proceso previo de cambio de pH desde (7 a 3,5 volviendo a 7) con diferentes ácidos: láctico (RLáctico), clorhídrico (RClorhídrico), fosfórico (RFosfórico), cítrico (RCítrico), acético (RAcético) a pH 7.

Una fracción de la cadena peptídica del CMP (aprox. el 50%) se encuentra glicosilada en diferentes grados, siendo el ácido siálico el glicósido más abundante (Thomä-Worringer y col., 2006). Siegert y col. (2012) encontraron que a valores de pH ácidos los glicósidos de la cadena peptídica del CMP se hidrolizan aún almacenando la muestra a 5 °C. En los ensayos realizados, las soluciones se mantuvieron durante 1 hora a pH 3,5, condición suficiente para hidrolizar parcialmente (o totalmente) a los grupos glicosilados de la cadena peptídica del CMP. El efecto en la intensidad de los espectros FTIR del CMP cuyo pH ha sido revertido previamente con los ácidos clorhídrico, fosfórico, cítrico, láctico y acético se muestra en la **Figura 4.6**. La espectroscopía FTIR proporciona una metodología rápida y simple para reconocer la glicosilación de manera semicuantitativa y monitorear los procesos de deglicosilación, en contraste con otras metodologías más complejas como la espectrometría de masas (Khajepour y col., 2006).

Se encuentran presentes, en todos los espectros, un valle ancho a 3300 cm^{-1} que se adjudica a estiramientos O-H y las señales cercanas a 2900 cm^{-1} a los estiramientos C-H. Los espectros del CMP revertidos con los ácidos fosfórico, clorhídrico, acético y cítrico mostraron una señal a 2358 cm^{-1} que posiblemente se deba a una interferencia de CO_2 del ambiente ya que el estiramiento asimétrico entre el C y el O da una señal a 2350 cm^{-1} (Seichter y col., 2017). Las otras bandas más fácilmente reconocidas son las amidas I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) y amidas II ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$). Estas bandas fueron más intensas para el CMP que sufrió una reversión de pH con los ácidos cítrico y láctico. Las señales de la banda amida I se adjudican a los estiramientos C=O y en la amida II a las flexiones N-H y los estiramientos C-N (Sheng y col., 2017). La señal de 990 cm^{-1} que representa a los residuos fosforilados, se observa en todos los espectros, al igual que la señal correspondiente a los grupos carboxilatos (COO^-) a 1400 cm^{-1} .

Cuando se comparan los espectros de absorción del CMP antes y después del tratamiento de reversión de pH, se pueden observar notables diferencias en la zona entre 1200 y 1000 cm^{-1} . Estas bandas representan la absorción de las proteínas que tienen asociadas cadenas glicosiladas (Khajepour y col., 2006; Sheng y col., 2017). Las proteínas deglicosiladas, como por ejemplo el Citocromo c, no tienen absorción entre 1000 y 1200 cm^{-1} ; en cambio, la mucina y el colágeno, que están glicosiladas, tienen una fuerte absorción a 1100 cm^{-1} (Khajepour y col., 2006). Se observa

claramente en la **Figura 4.6** una similitud en las bandas de esa señal ($1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$) en los espectros del CMP sin tratamiento y aquellos que han recibido un tratamiento previo con ácido fosfórico, clorhídrico y cítrico. Los espectros del CMP cuyo tratamiento fue realizado con los ácidos acético y láctico presentaron una disminución drástica de esta señal en comparación a los otros espectros. Un resultado similar fue encontrado por Zhang y col. (2018), quienes caracterizaron la glicosilación de péptidos de suero de queso a través de FTIR. El péptido glicosilado con galactosa presentó mayor absorción entre $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ que aquel sin tratamiento. También Jia y col. (2020), reconocieron la glicosilación de WPI con xilooligosacáridos (XOS) por FTIR. Después que el WPI se unió covalentemente con los XOS, el número de grupos hidroxilos en la cadena peptídica aumentó, y por consiguiente también la intensidad del pico de absorción en 1061 cm^{-1} .

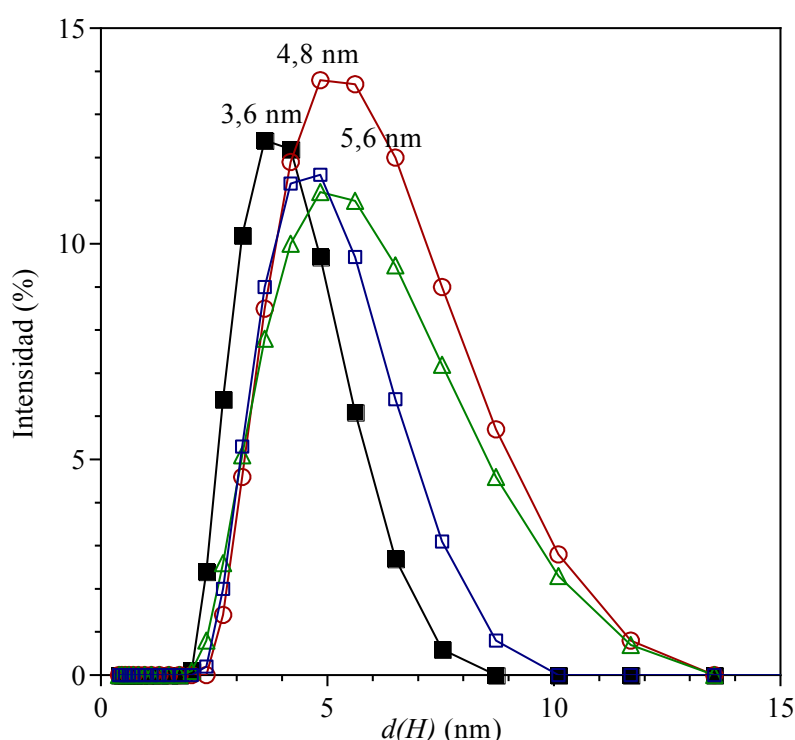


Figura 4.7. Pico predominante (en escala lineal) de las distribuciones de tamaños de partículas por intensidad para soluciones de CMP al 3 % (p/p) a 25°C y pH 7,0 con tratamiento previo de reversión de pH con los ácidos: clorhídrico (■); láctico (□); acético (○) y cítrico (△).

Los resultados mostrados en las **Figuras 4.3, 4.4 y 4.5** confirmaron que la deglicosilación (parcial) con los ácidos láctico o acético no afectó a la capacidad ligante de calcio en relación a la muestra de CMP sin tratamiento. La deglicosilación del CMP, si afecta a otras propiedades funcionales, como por ejemplo la gelificación (Farías y col., 2010; Farías y col., 2016).

Los estudios realizados (solubilidad en buffer y etanol) confirmaron que el tratamiento de reversión del pH para el CMP con ácido clorhídrico, cítrico y fosfórico incrementó la capacidad ligante de calcio. La presencia de los aniones fosfato y citrato, con alta afinidad por el calcio iónico, pueden explicar la mayor capacidad ligante para el CMP cuyo pH fue ajustado previamente con estos ácidos, pero no lo explica para el caso del clorhídrico. El autoensamblaje del CMP y la reversibilidad por pH depende del tipo de anión del ácido utilizado (Farías y col., 2016). Las distribuciones de tamaños de partículas del primer y predominante pico del CMP previamente tratado con un cambio de pH se muestran en la **Figura 4.7**. Cuando el pH se ajusta con ácidos orgánicos (cítrico, acético, láctico), se favorecen estructuras de CMP más asociadas (tetrámeros y hexámeros) vía uniones hidrofóbicas que no pueden disociarse al incrementar el pH (Farías y col., 2016). Cuando el pH se ajusta con HCl, se forman principalmente dímeros (3,6 nm) (vía interacciones hidrofóbicas) que tampoco son afectados por un cambio de pH posterior (Farías y col., 2010; Martínez y col., 2011). Evidentemente, son los dímeros de CMP los que se encuentran más disponibles para interaccionar con el calcio que los monómeros (2,3 nm), tetrámeros (4,8 nm) o hexámeros (5,6 nm).

2. Inhibición de la precipitación de hidroxicarboxilatos de calcio (Ca_3Cit_2 y CaLac_2) por el CMP

Como se mencionó anteriormente, la absorción de calcio depende del calcio libre, la cual está afectada por la presencia de fosfatos, carbonatos, oxalatos, fitatos (entre otros aniones) que lo precipitan y la unión de calcio a moléculas orgánicas como los péptidos pueden inhibir su precipitación. En la Sección anterior se demostró la inhibición de la precipitación de fosfato de calcio por la presencia del CMP, fenómeno que se denomina sobresaturación. La sobresaturación de las sales de calcio podría ser la clave del mecanismo para incrementar la bioaccesibilidad de los hidroxicarboxilatos de calcio, que se usan en la fortificación de alimentos y bebidas, como el L-lactato de calcio, el D-gluconato de calcio y el citrato de calcio (Garcia y col., 2018).

A pesar de su baja solubilidad en agua, el citrato de calcio (Ca_3Cit_2) es la sal más prescrita como suplemento dietario para personas que sufren osteoporosis (Cano y col., 2018; Garcia y col., 2018). La mayor biodisponibilidad del citrato de calcio en comparación al carbonato de calcio no está completamente explicada. El citrato, así como otros hidroxicarboxilatos (gluconato, lactato, acetato o lactobionato) pueden formar soluciones fuertemente sobresaturadas en condiciones isotérmicas y biológicamente relevantes (pH neutro a alcalino). Entender la interacción entre el calcio con algunos de los iones presentes en la leche (citrato y lactato, en este estudio) y el CMP, no solamente es importante desde el punto de vista nutricional, sino también por su aplicación tecnológica, por ejemplo, evitar la formación de incrustaciones en cañerías y depósitos. Además, la sobresaturación del lactato de calcio en quesos de larga maduración podría ser una solución a este problema tecnológico que se presenta en quesos coloreados como el Cheddar los cuales presentan manchas blancas por la precipitación de lactato de calcio en su superficie (Phadungath y Metzger, 2011).

De acuerdo con esto, el objetivo de esta Sección fue investigar la inhibición de la precipitación de citrato y lactato de calcio en agua ultrapura y en presencia de CMP. Se eligieron estas sales también por su efecto opuesto en la solubilidad (más soluble a bajas temperaturas). La entalpía de disolución del citrato de calcio tetrahidratado es exotérmica (Vavrusova y Skibsted, 2016) y la del lactato de calcio pentahidratado es endotérmica (Vavrusova y col., 2014b).

2.1. Ca_3Cit_2

La solubilidad se determinó a través de la titulación con EDTA de soluciones sobresaturadas de citrato de calcio tetrahidratado en agua ultrapura y en presencia de CMP bajo diferentes condiciones de temperatura (10, 25 y 40 °C) según la técnica descrita en la **Sección 1.15, Materiales y Métodos**. En todo momento el pH fue 7.

Los resultados mostraron que la solubilidad del citrato de calcio tetrahidratado en agua ultrapura disminuyó con la temperatura siendo $0,0215 \pm 0,0008 \text{ mol L}^{-1}$ (10 °C); $0,0204 \pm 0,0007 \text{ mol L}^{-1}$ (25 °C) y $0,0155 \pm 0,0003 \text{ mol L}^{-1}$ (40 °C) (**Figura 4.8**). La fuerza iónica de este ensayo estuvo comprendida entre 0,011 y 0,013 mol L^{-1} . Este comportamiento, opuesto al de la mayoría de las sales de calcio, en el cual la solubilidad aumenta al bajar la temperatura, se llama solubilidad inversa (Kubantseva y col., 2004; Vavrusova y col., 2014b).

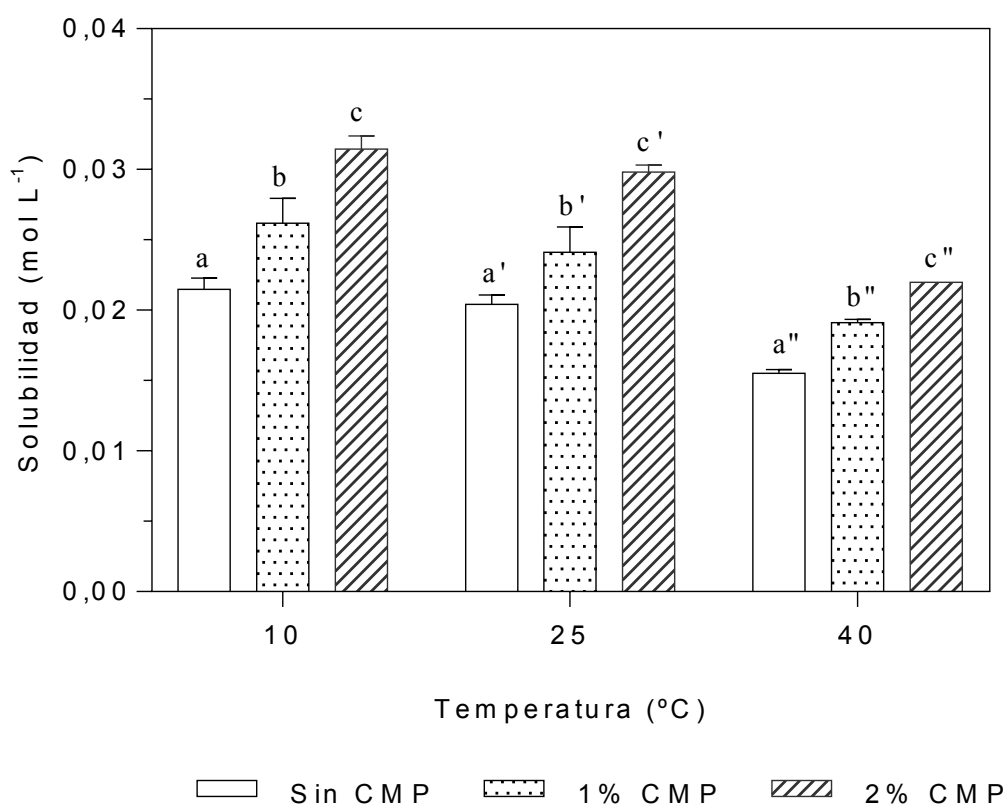


Figura 4.8. Solubilidad del citrato de calcio en función de la temperatura (10, 25 y 40 °C) en ausencia de CMP y presencia de 1 % y 2 % de CMP. Las barras representan el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Vavrusova y col. (2016) determinaron la solubilidad del citrato de calcio tetrahidratado en agua entre 0 y 100 °C y también hallaron un comportamiento similar al reportado en esta tesis, en el cual la solubilidad disminuyó con el incremento de la temperatura. Sin embargo, los valores informados por estos autores fueron menores: una solubilidad de $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (10 °C); $5,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (25°C) y $4,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (40°C) a pH 7. Singh y col. (2007) hallaron una solubilidad de $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8 con una fuerza iónica de $0,154 \text{ mol L}^{-1}$.

En presencia de CMP, se observó un importante aumento de la solubilidad para las tres temperaturas estudiadas: entre un 18 - 23% con 1 % de CMP y entre 42 – 46 % con 2 % de CMP (**Figura 4.8**). Cuanta más cantidad de CMP se incorporó mayor fue el aumento de la solubilidad. A 40 °C, dónde el citrato de calcio es más insoluble, la presencia de 2% CMP tuvo el mismo efecto en solubilizarlo que al disminuir la temperatura a 10 °C.

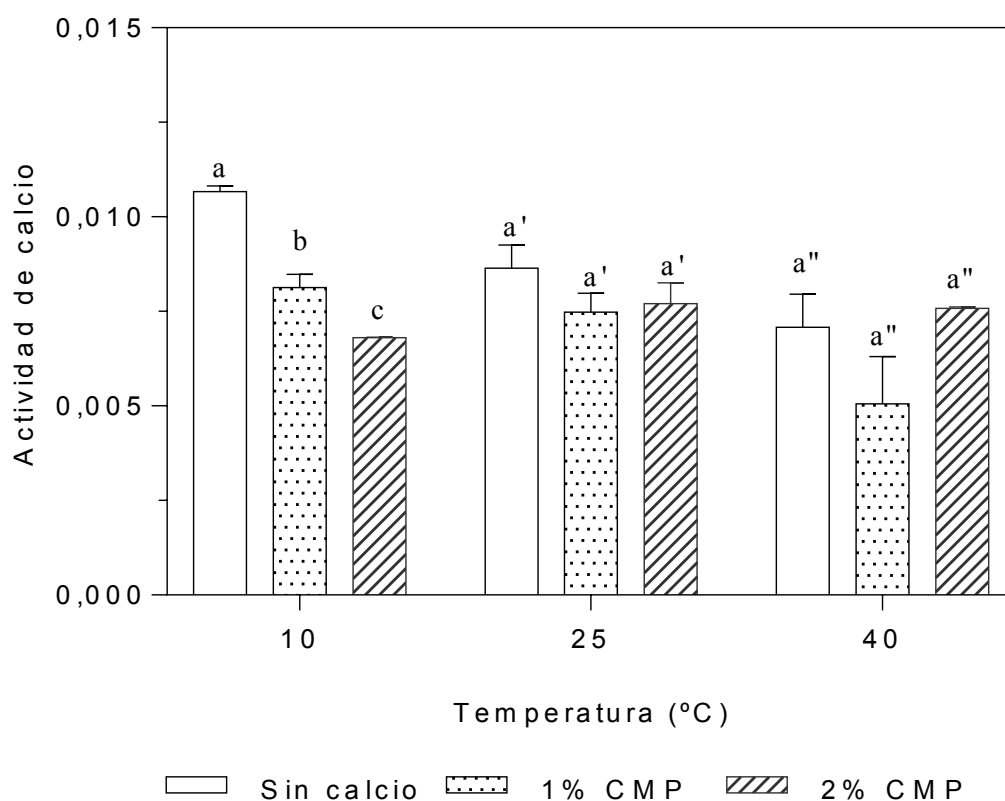
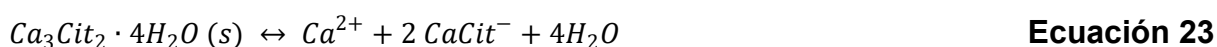


Figura 4.9. Actividad de calcio en función de la temperatura (10, 25 y 40 °C) en ausencia de CMP y presencia de 1 % y 2 % de CMP. Las barras representan el desvío estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas

La actividad de los iones calcio de las soluciones saturadas de citrato de calcio tetrahidratado en agua fue determinada electroquímicamente con un electrodo de ion selectivo de calcio. Tal como puede observarse en la **Figura 4.9**, la actividad de calcio decreció con la temperatura desde $0,0107 \pm 0,0002$ (10 °C), $0,0086 \pm 0,0006$ (25 °C) hasta $0,0071 \pm 0,0009$ (40 °C). En el trabajo de Vavrusova y col. (2016) se encontraron valores de actividad de calcio un orden menor al hallado en esta tesis, pero con un comportamiento similar (más alta a 10 °C y más baja a 25 y 40°C). La menor actividad de calcio a temperaturas más altas correspondió a su menor solubilidad (Vavrusova y col., 2016). Se encontró una importante disminución de la actividad de calcio en presencia de CMP a 10 °C, mostrando que, en la situación de mayor solubilidad, el calcio no se encuentra libre sino ligado al CMP. Por otro lado, a 25 y 40 °C la actividad no fue afectada por la presencia de CMP.

El aumento de la solubilidad del $\text{Ca}_3\text{Cit}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ está relacionado con el equilibrio que se muestra en la **Ecuación 25**.



A bajas temperaturas, el citrato de calcio es más soluble y el CMP actúa como ligante de calcio libre, por eso baja la actividad de calcio. A temperaturas más altas, donde el citrato de calcio es insoluble, el CMP interacciona menos fuertemente y no afecta a la actividad de calcio.

Las especies involucradas en los equilibrios según las **Ecuaciones 23 y 24**, se muestran en la **Figura 4.10**. Puede observarse que a 10 °C, la presencia de 2 % (p/p) de CMP desplazó el equilibrio de la **Ecuación 23** hacia la derecha, porque aumentó la concentración de CitCa^- , sin embargo, el equilibrio no fue afectado con la presencia de 1 % (p/p). A 25 °C y en menor medida a 40 °C, también se observó un incremento en la concentración de CitCa^- con la incorporación de CMP. Estos resultados confirmaron que el CMP es sólo efectivo en solubilizar el citrato de calcio tetrahidratado (**Ecuación 23**), pero no puede competir con el Cit^{3-} como ligante de calcio, al contrario, su presencia desplaza el equilibrio hacia la derecha en la **Ecuación 24**.

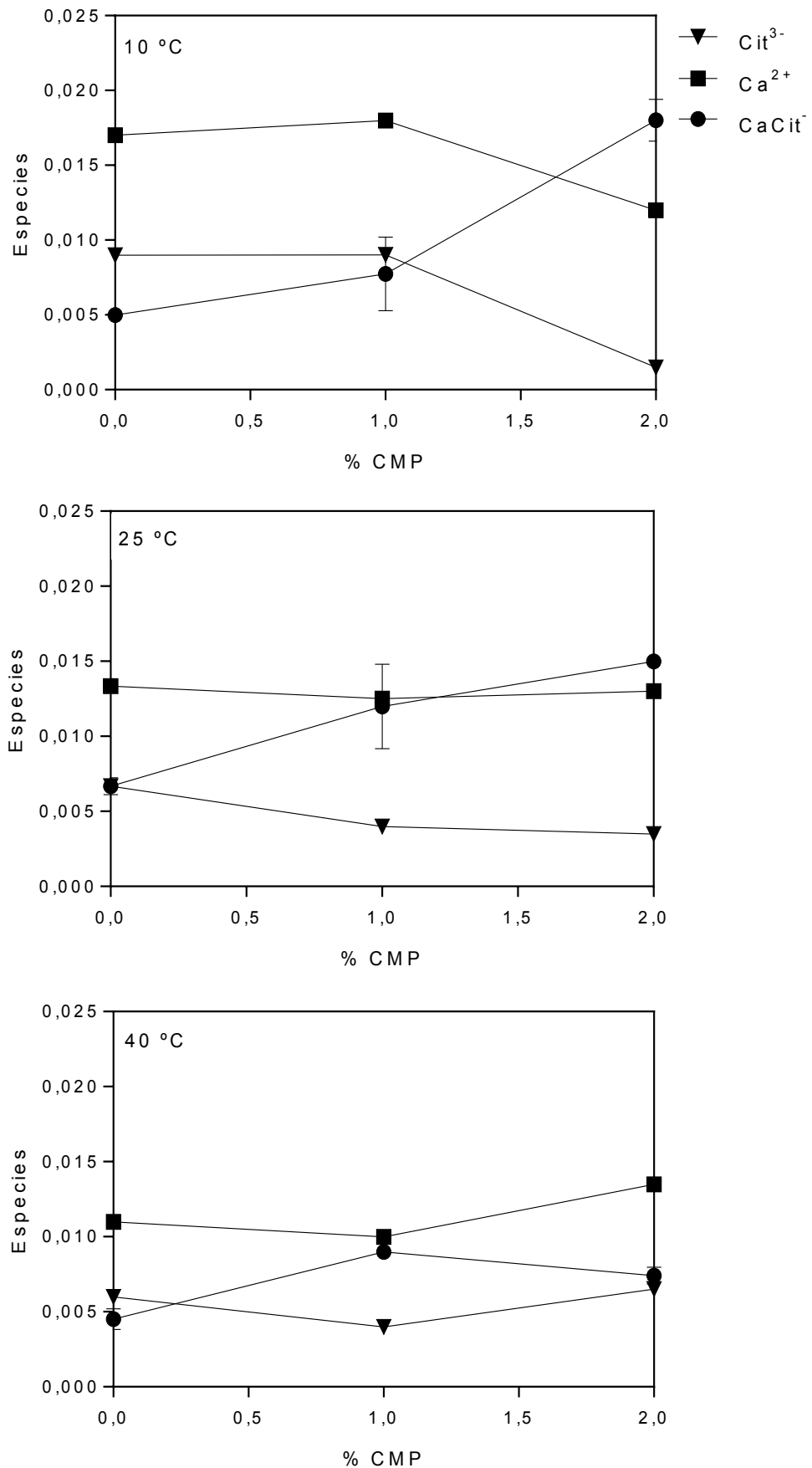


Figura 4.10. Concentración molar de cada una de las especies $[\text{Cit}]$, $[\text{Ca}^{2+}]$, $[\text{CaCa}]$ del equilibrio de la Ecuación 24 a las siguientes temperaturas: 10 °C (A); 25 °C (B) y 40 °C (C).

2.2. CaLac₂

La solubilidad del lactato de calcio pentahidratado en agua ultrapura y en presencia de CMP se analizó bajo diferentes condiciones de temperatura (5, 10 y 20 °C) según la técnica descrita en la **Sección 1.15, Materiales y Métodos**. En todo momento el pH fue 7.

La **Figura 4.11** muestra que la solubilidad del lactato de calcio pentahidratado en agua ultrapura aumentó con la temperatura siendo $3,16 \pm 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (5 °C); $3,78 \pm 0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (10 °C) y $3,88 \pm 0,08 \text{ mol L}^{-1}$ (20 °C). La solubilidad a 20 °C fue muy similar al reportado por Vavrusova y col. (2014b). Se observa claramente en la misma figura que en presencia de 0,3 % de CMP disminuyó la solubilidad a 5 y 10 °C en un 30 %. Asimismo, a 20 °C la presencia de 0,3 y 0,5 % de CMP aumentó la solubilidad entre un 20 y 24 %.

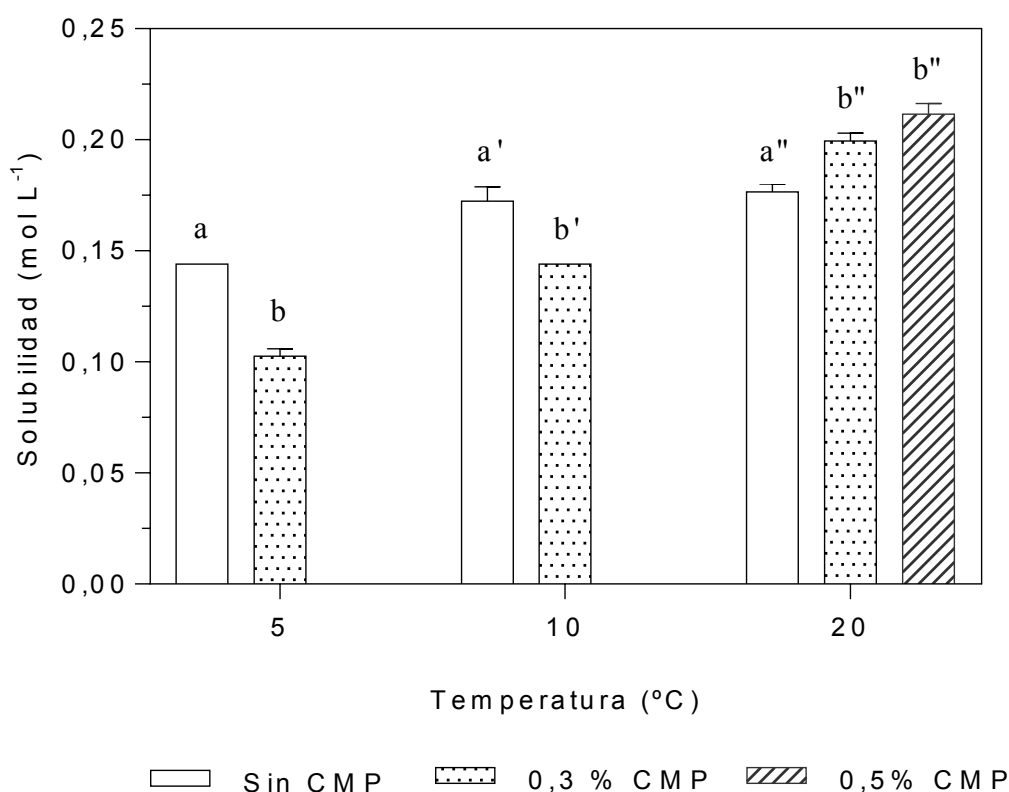


Figura 4.11. Solubilidad del lactato de calcio en función de la temperatura (5, 10 y 20 °C) en ausencia de CMP y presencia de 0,3 % y 0,5 % de CMP. Las barras representan el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

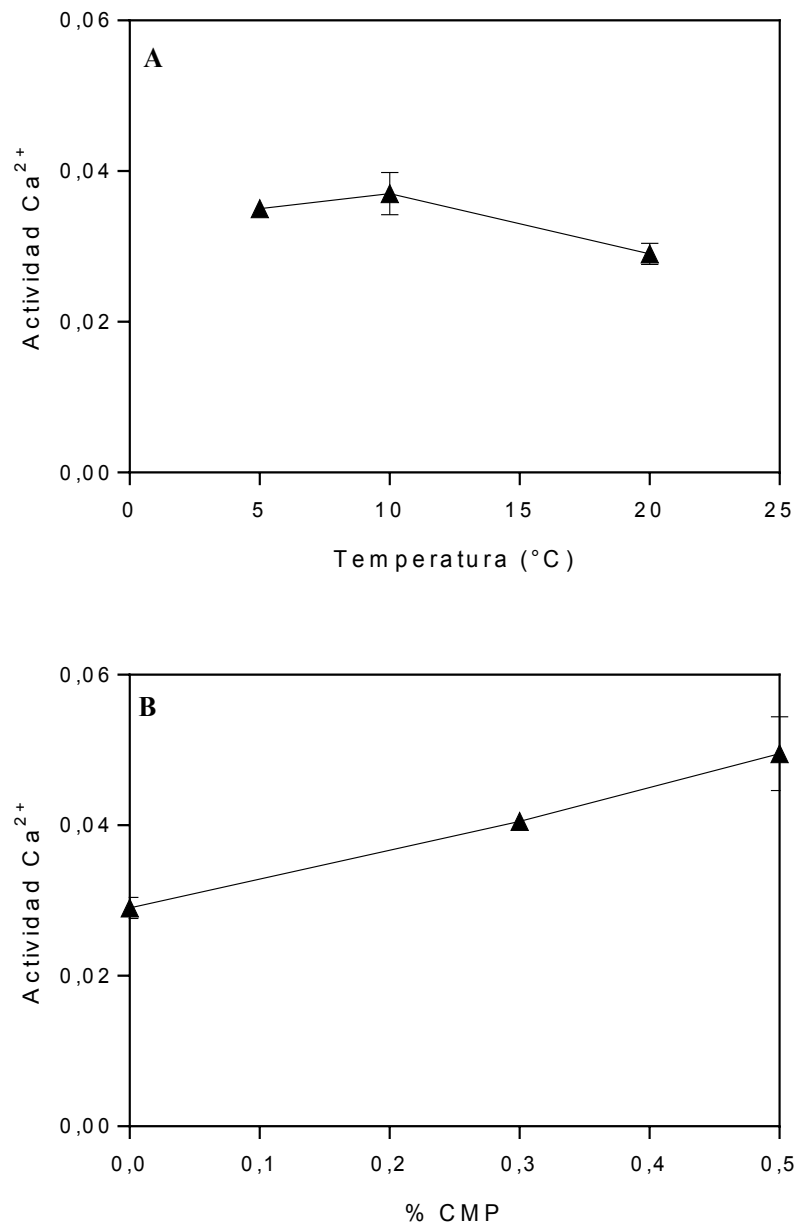
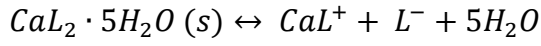


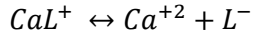
Figura 4.12. Actividad de calcio en función de: **A)** la temperatura y **B)** presencia de CMP a 20 $^{\circ}\text{C}$. Las barras representan el desvío estándar.

La **Figura 4.12 A** muestra que la temperatura afectó ligeramente la actividad de calcio del lactato de calcio pentahidratado, siendo menor a 20 $^{\circ}\text{C}$, aproximadamente 0,03. A 20 $^{\circ}\text{C}$, se observó un aumento de la actividad de calcio al incorporar 0,3 y 0,5 % de CMP (**Figura 4.12 B**). Estos resultados indicaron que hay más calcio libre en presencia de CMP.

La disolución del lactato de calcio pentahidratado está dada por los siguientes equilibrios:



Ecuación 29



Ecuación 30

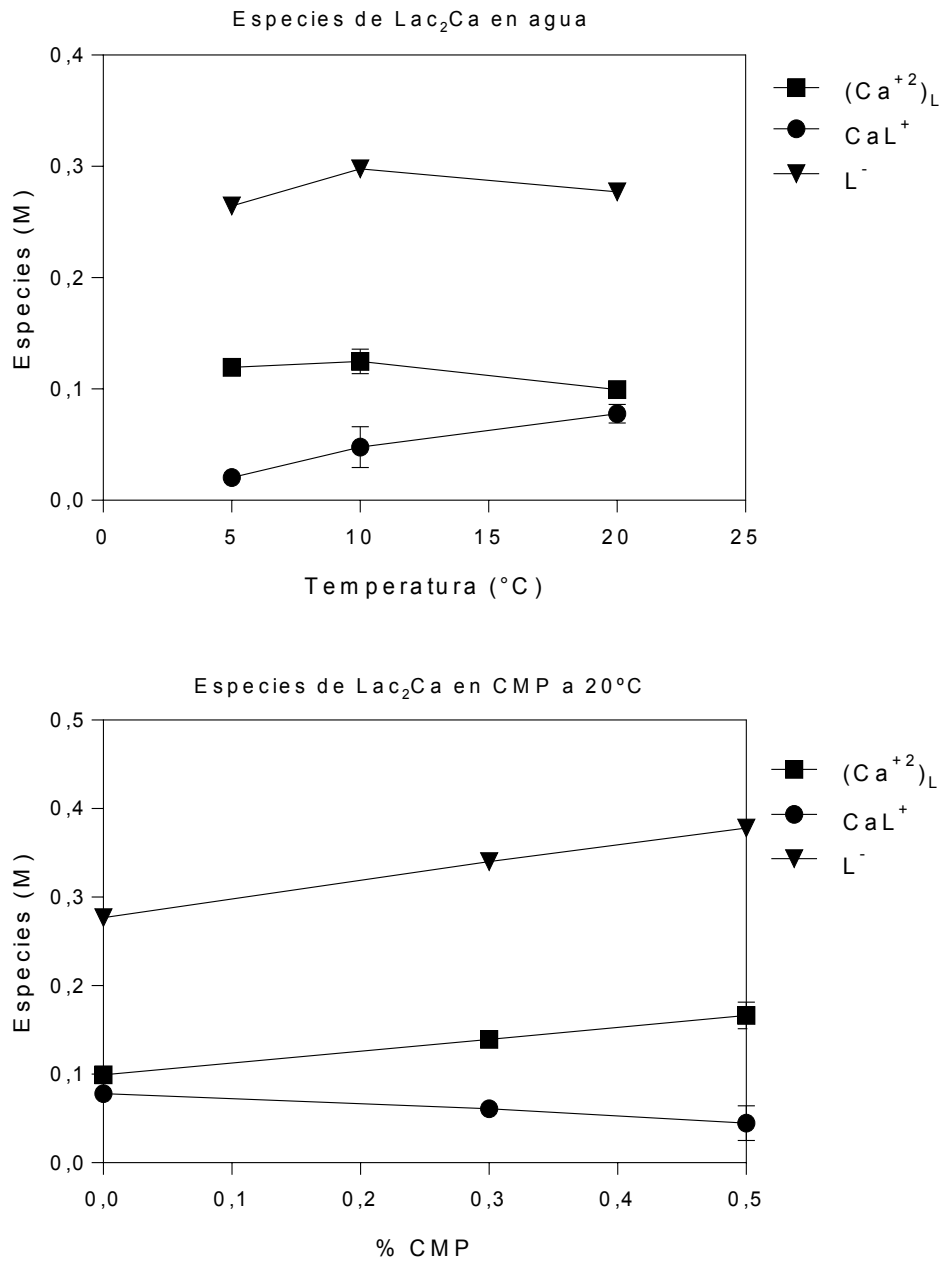


Figura 4.13. Concentración molar de cada una de las especies [L⁻], [Ca²⁺], [CaL⁺] del equilibrio de la **Ecuación 30** en función de: **A)** la temperatura y **B)** presencia de CMP a 20 °C. Las barras representan el desvío estándar.

En la **Figura 4.13** se muestran las diferentes especies que forman parte de los equilibrios, según las **Ecuaciones 29 y 30**. En agua ultrapura (**Figura 4.13 A**) se observó que al aumentar la temperatura a 20 °C se incrementó la concentración de $[\text{CaL}^+]$, mientras que las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ y $[\text{L}^-]$ se mantuvieron prácticamente constantes. Estos resultados indicaron que el segundo de los equilibrios (**Ecuación 30**) se encuentra completamente desplazado hacia la derecha en agua. La **Figura 4.13 B** muestra que a 20 °C y en presencia de CMP, disminuyó la concentración de $[\text{CaL}^+]$, y aumentó la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]$ y $[\text{L}^-]$. Los resultados mostraron entonces que el CMP tiene más afinidad con la especie $[\text{CaL}^+]$ que con el $[\text{Ca}^{2+}]$, por eso aumenta la solubilidad solamente a altas temperaturas, aún a muy baja concentración.

Conclusiones generales del Capítulo 4

El CMP evitó la precipitación de fosfato de calcio que se lleva a cabo en el medio intestinal (rico en fosfatos y pH alcalino) y que afecta la bioaccesibilidad del calcio, lo cual está relacionado a su efectividad como ligante de calcio. Esta capacidad de inhibir la precipitación del fosfato puede ser incrementada mediante un cambio de reversión de pH a 3,5 con los ácidos cítrico, fosfórico y clorhídrico y luego regresándolo a 7. La presencia de los aniones citrato y fosfato, de alta afinidad por el calcio, explicarían la mayor capacidad ligante. Por otro lado, los ácidos acético y láctico favorecen la deglicosilación del CMP, sin embargo, parecen no afectar su capacidad ligante de calcio.

El CMP aumenta la solubilidad del citrato de calcio tetrahidratado principalmente interactuando con el $[Ca^{2+}]$ liberado luego de la solubilización de la sal sólida. Este efecto de sobresaturación es muy interesante para optimizar la biodisponibilidad de suplementos dietarios que utilicen citrato de calcio.

En el caso del lactato de calcio pentahidratado, el CMP también aumentó su solubilidad al aumentar la temperatura (25 °C) a pH 7. Desde un punto de vista tecnológico es contraproducente ya que, al bajar la temperatura, la solución sobresaturada de $CaLac_2$ precipitaría. El aumento de la solubilidad está relacionado principalmente con la interacción del CMP con el $[CaL^+]$.

Referencias

- Bao, I., Lv, Y., Yang, B. C., Ren, C. G. y Guo, T.-S. (2008). "A Study of the Soluble Complexes Formed during Calcium Binding by Soybean Protein Hydrolysates." *Journal of food science* **73**: C117-121.
- Bronner, F. y Pansu, D. (1999). "Nutritional aspects of calcium absorption." *J Nutr* **129**(1): 9-12.
- Budseekoad, S., Yupanqui, C. T., Sirinupong, N., Alashi, A. M., Aluko, R. E. y Youravong, W. (2018). "Structural and functional characterization of calcium and iron-binding peptides from mung bean protein hydrolysate." *Journal of Functional Foods* **49**: 333-341.
- Burgos, V. E., Binaghi, M. J., De Ferrer, P. A. R. y Armada, M. (2018). "Effect of precooking on antinutritional factors and mineral bioaccessibility in kiwicha grains." *Journal of Cereal Science* **80**: 9-15.
- Cano, A., Chedraui, P., Goulis, D. G., Lopes, P., Mishra, G., Mueck, A., y col. (2018). "Calcium in the prevention of postmenopausal osteoporosis: EMAS clinical guide." *Maturitas* **107**: 7-12.
- Chen, D., Mu, X., Huang, H., Nie, R., Liu, Z. y Zeng, M. (2014). "Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats." *Journal of Functional Foods* **6**: 575-584.
- Chen, M., Ji, H., Zhang, Z., Zeng, X., Su, W. y Liu, S. (2019). "A novel calcium-chelating peptide purified from *Auxis thazard* protein hydrolysate and its binding properties with calcium." *Journal of Functional Foods* **60**: 103447.
- D'haese, P. C., Spasovski, G. B., Sikole, A., Hutchison, A., Freemont, T. J., Sulkova, S., y col. (2003). "A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol™) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients." *Kidney International* **63**: S73-S78.
- Farías, M. E., Martínez, M. J. y Pilosof, A. M. R. (2010). "Casein glycomacropéptide pH-dependent self-assembly and cold gelation." *International Dairy Journal*. **20**: 79-88.
- Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2016). "The influence of acid type on self-assembly, rheological and textural properties of caseinomacropéptide." *International Dairy Journal* **55**: 17-25.
- García, A. C., Vavrusova, M. y Skibsted, L. H. (2018). "Supersaturation of calcium citrate as a mechanism behind enhanced availability of calcium phosphates by presence of citrate." *Food Research International* **107**: 195-205.
- Jia, C., Cao, D., Ji, S., Lin, W., Zhang, X. y Muhoza, B. (2020). "Whey protein isolate conjugated with xylo-oligosaccharides via maillard reaction: Characterization, antioxidant capacity, and application for lycopene microencapsulation." *LWT* **118**: 108837.
- Jung, W.-K., Karawita, R., Heo, S.-J., Lee, B.-J., Kim, S.-K. y Jeon, Y.-J. (2006). "Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis." *Process Biochemistry* **41**(9): 2097-2100.
- Khajehpour, M., Dashnau, J. L. y Vanderkooi, J. M. (2006). "Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins." *Analytical Biochemistry* **348**(1): 40-48.
- Koiwa, F., Yokoyama, K., Fukagawa, M. y Akizawa, T. (2018). "Efficacy and Safety of Sucroferric Oxyhydroxide and Calcium Carbonate in Hemodialysis Patients." *Kidney International Reports* **3**(1): 185-192.
- Kubantseva, N., Hartel, R. W. y Swearingen, P. A. (2004). "Factors Affecting Solubility of Calcium Lactate in Aqueous Solutions." *Journal of Dairy Science* **87**(4): 863-867.
- Martínez, M. J., Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. (2011). "Casein glycomacropéptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating." *Food Hydrocolloids* **25**(5): 860-867.
- Phadungath, C. y Metzger, L. E. (2011). "Effect of sodium gluconate on the solubility of calcium lactate." *Journal of Dairy Science* **94**(10): 4843-4849.
- Sato, R., Shindo, M., Gunshin, H., Noguchi, T. y Naito, H. (1991). "Characterization of phosphopeptide derived from bovine β -casein: an inhibitor to intra-intestinal

- precipitation of calcium phosphate." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1077**(3): 413-415.
- Seichter, F., Vogt, J., Radermacher, P.y Mizaikoff, B. (2017). "Response-surface fits and calibration transfer for the correction of the oxygen effect in the quantification of carbon dioxide via FTIR spectroscopy." *Analytica Chimica Acta* **972**: 16-27.
- Sheng, L., He, Z., Chen, J., Liu, Y., Ma, M.y Cai, Z. (2017). "The impact of N-glycosylation on conformation and stability of immunoglobulin Y from egg yolk." *International Journal of Biological Macromolecules* **96**: 129-136.
- Siegert, N., Tolkach, A.y Kulozik, U. (2012). "The pH-dependent thermal and storage stability of glycosylated caseinomacropeptide." *LWT - Food Science and Technology* **47**(2): 407-412.
- Singh, G., Arora, S., Sharma, G. S., Sindhu, J. S., Kansal, V. K.y Sangwan, R. B. (2007). "Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk." *LWT - Food Science and Technology* **40**(4): 625-631.
- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J.y López-Fandiño, R. (2006). "Health effects and technological features of caseinomacropeptide." *International Dairy Journal* **16**(11): 1324-1333.
- Vavrusova, M., Liang, R.y Skibsted, L. H. (2014a). "Calcium nutrition. Bioavailability and fortification." *LWT - Food Science and Technology* **59**(2): 1198-1204.
- Vavrusova, M., Liang, R.y Skibsted, L. H. (2014b). "Thermodynamics of Dissolution of Calcium Hydroxycarboxylates in Water." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(24): 5675-5681.
- Vavrusova, M.y Skibsted, L. H. (2016). "Aqueous solubility of calcium citrate and interconversion between the tetrahydrate and the hexahydrate as a balance between endothermic dissolution and exothermic complex formation." *International Dairy Journal* **57**: 20-28.
- Zhang, K., Li, J., Hou, H., Zhang, H.y Li, B. (2019). "Purification and characterization of a novel calcium-binding decapeptide from Pacific cod (*Gadus Macrocephalus*) bone: Molecular properties and calcium chelating modes." *Journal of Functional Foods* **52**: 670-679.
- Zhang, X., Gao, H., Wang, C., Qayum, A., Mu, Z., Gao, Z., y col. (2018). "Characterization and comparison of the structure and antioxidant activity of glycosylated whey peptides from two pathways." *Food Chemistry* **257**: 279-288.
- Zhao, L., Huang, S., Cai, X., Hong, J.y Wang, S. (2014). "A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate." *Journal of Functional Foods* **10**: 46-53.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo se ha logrado caracterizar el desempeño del CMP como potencial ligante de calcio a través del estudio de su interacción a pH 7 y 3,5 con dos sales de calcio comúnmente utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica: CaCl_2 y CaAc_2 . La comparación de los resultados evidenció una influencia del anión sobre el mecanismo de interacción.

A pH 7, las soluciones de CMP admitieron la incorporación de grandes cantidades de CaCl_2 , lo que indicaría que puede ser una excelente alternativa para aumentar su bioaccesibilidad. Las soluciones concentradas de CMP y CaAc_2 , gelificaron en muy corto tiempo (< 17 h), con lo cual su uso no sería recomendable en bebidas.

A pH 3,5, los geles de CMP también admitieron grandes cantidades de ambas sales de calcio. La adición de CaCl_2 no alteró a las propiedades texturales del gel, sin embargo, la adición de CaAc_2 aumentó el carácter viscoso de los geles que afectó principalmente a la dureza. La formación de geles de CMP y sales de calcio a pH 3,5 también podría ser una excelente alternativa para incrementar la solubilidad de las sales de fortificación.

Por otro lado, la capacidad ligante de calcio del CMP se demostró por numerosas técnicas (DLS, diálisis, conductimetría, solubilidad de CaCl_2 en etanol, construcción de isothermas de unión de Ca^{2+}) y se corroboró que la capacidad máxima de unión de calcio del CMP es aproximadamente **1,2 mmoles Ca^{2+} /g de CMP** que equivale a **9 mol Ca^{2+} /mol de CMP** a pH 7. En cuanto a su mecanismo de interacción, se concluye que la formación de estructuras asociadas de las moléculas del CMP en presencia de CaCl_2 es de a pares (desde monómeros a dímeros, tetrámeros, y finalmente hexámeros) y que un mol de CMP une muy fuertemente un mol de calcio (relación 1:1) con una K_{ap} de $2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ en un sitio de alta afinidad posiblemente relacionado con un sitio fosforilado (posiblemente Ser) del CMP. A concentraciones más altas de calcio en solución, el CMP podría ligar más calcio en sitios de baja afinidad y más débilmente unidos dependiendo del pH.

Finalmente se comprobó que el CMP evitó la precipitación de fosfato de calcio en condiciones alcalinas y que un tratamiento previo de reversión de pH con ácido cítrico o clorhídrico, aumentó el efecto. Además, el CMP aumentó la solubilidad del citrato de calcio y del lactato de calcio. Este efecto de sobresaturación es muy interesante para optimizar la bioaccesibilidad de suplementos dietarios.

Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un novedoso aporte a la bibliografía relacionada con péptidos ligantes de calcio y su potencial uso como nueva estrategia de fortificación. Los estudios aquí expuestos contribuyen a una base preliminar que justifica futuros estudios "in vivo".

